

明 細 書

基質特異性に優れたピロロキノリンキノン(PQQ)依存性グルコースデヒドロゲナーゼ改変体

技術分野

[0001] 本発明は基質特異性が改良された改変型グルコースデヒドロゲナーゼ(本出願では、グルコースデヒドロゲナーゼをGDHとも表記する。)に関し、詳しくはピロロキノリンキノン(本出願では、ピロロキノリンキノンをPQQとも表記する。)を補酵素とする改変型PQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼ(本出願では、PQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼをPQQGDHとも略記する。)、その製造法及びグルコースセンサーに関する。

また本発明は、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系における、野生型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の比活性を向上させる方法に関する。

さらに本発明は、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において、比活性が向上した改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素、その製造法、およびそれを用いたグルコースアッセイキットやグルコースセンサーに関する。

本発明の改変型PQQGDHは、臨床検査や食品分析などにおけるグルコースの定量に有用である。

背景技術

[0002] PQQGDHは、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコースデヒドロゲナーゼである。グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒するから、血糖の測定に用いることができる。血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマーカーとして臨床診断上きわめて重要な指標である。現在、血中グルコース濃度の測定は、グルコースオキシダーゼを使用したバイオセンサーを用いる方法が主流となっているが、反応が溶存酸素濃度に影響されるから、測定値に誤差が生じる可能性があった。このグルコースオキシダーゼにかわる新たな酵素としてPQQ依存性グルコース脱水素酵素が注目されている。

[0003] 我々のグループは、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) NCIMB11517株が、PQQ依存性グルコース脱水素酵素を産生することを見出し、遺伝子のクローニングならびに高発現系を構築した(特許文献1参照)。PQQ依存性グルコース脱水素酵素はグルコースオキシダーゼに比べて基質特異性に問題点があった。

特許文献1:特開平11-243949号公報

[0004] また、ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素をバイオセンサーに用いる場合、一般的な血糖モニターでは、フェリシアン化物イオンがメディエーターとして用いられているが、そのストリップ上では、酵素は検体の血液により溶解されることになるが、血液は、水や他の一般的な試薬に用いられる溶媒と比較して、粘度が高く、溶解性が低いので、ストリップ上に添加する酵素量は、タンパク量として少ない方がより望ましい。そのため、単位タンパク質あたりの酵素活性、すなわち比活性、が向上したピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の取得が望まれていた。

なお、これまでフェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において、比活性が向上した改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素に関する報告はない。

図面の簡単な説明

[0005] [図1]Q76N、Q76E、Q168I、Q168V、Q76T、Q76M、Q168A、野生型、Q76G、Q76Kの至適pHの測定結果を示す。横軸はpH、縦軸は相対活性を示す。図中、黒丸(Acetate)が0.22% Triton-X100を含む50mM 酢酸緩衝液(pH3.0〜6.0)で酵素活性を測定した結果である。同様に、黒四角(PIPES)が0.22% Triton-X100を含む50mM PIPES-NaOH緩衝液(pH6.0〜7.0)、黒三角(K-PB)が0.22% Triton-X100を含む50mMリン酸緩衝液(pH5.0〜8.0)、黒菱形(Tris-HCl)が0.22% Triton-X100を含む50mM トリス塩酸緩衝液(pH7.0〜9.0)中でそれぞれ酵素活性を測定した結果である。なお測定値は最大活性を示したものを100%とした相対値で示している。

[図2]Q76Kのグルコース定量性の確認結果を示す。横軸は1水準の希釈系列、縦軸はグルコース濃度の測定値(mg/dl)を示す。

[図3]Q76Kのマルトース作用性の確認結果を示す。横軸は、上乗せしたマルトース濃度 (mg/dl)、縦軸はマルトース添加濃度が0のときの測定値を100%としたときの相対%を示す。図中、黒三角はサンプルとして100mg/dlのグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合、黒菱形はサンプルとして300mg/dlのグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合をそれぞれ示す。

[図4]Q76Eのマルトース作用性の確認結果を示す。横軸は、上乗せしたマルトース濃度 (mg/dl)、縦軸はマルトース添加濃度が0のときの測定値を100%としたときの相対%を示す。図中、黒三角はサンプルとして100mg/dlのグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合、黒菱形はサンプルとして300mg/dlのグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合をそれぞれ示す。

[図5]Q168Vのマルトース作用性の確認結果を示す。横軸は、上乗せしたマルトース濃度 (mg/dl)、縦軸はマルトース添加濃度が0のときの測定値を100%としたときの相対%を示す。図中、黒三角はサンプルとして100mg/dlのグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合、黒菱形はサンプルとして300mg/dlのグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合をそれぞれ示す。

[図6]Q168Aのマルトース作用性の確認結果を示す。横軸は、上乗せしたマルトース濃度 (mg/dl)、縦軸はマルトース添加濃度が0のときの測定値を100%としたときの相対%を示す。図中、黒三角はサンプルとして100mg/dlのグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合、黒菱形はサンプルとして300mg/dlのグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合をそれぞれ示す。

[図7]野生型酵素のマルトース作用性の確認結果を示す。横軸は、上乗せしたマルトース濃度 (mg/dl)、縦軸はマルトース添加濃度が0のときの測定値を100%としたときの相対%を示す。図中、黒三角はサンプルとして100mg/dlのグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合、黒菱形はサンプルとして300mg/dlのグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合をそれぞれ示す。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、従来技術の課題を背景になされたもので、PQQGDHの基質特異性を

課題としてその改良に関するものである。

また、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において、ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の比活性を野生型と比較して向上させることを課題とするものである。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは上記課題を解決するため、鋭意研究した結果、PQQGDHの特定の領域においてアミノ酸変異を導入することにより基質特異性を向上させることを可能にした。

さらに本発明者らは、野生型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸を欠失、置換もしくは付加することにより、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において、ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の比活性を野生型と比較して向上させることを可能にし、本発明を完成するに至った。即ち本発明は、

[項1]

野生型のピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ(PQQGDH)よりも二糖類に対する作用性が低下した改変型PQQGDH。

[項2]

野生型のピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ(PQQGDH)よりも安定性が向上した項1に記載の改変型PQQGDH。

[項3]

野生型ピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ(PQQGDH)のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸を欠失、置換もしくは付加することにより、野生型と比較して、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において、比活性を向上させる方法

[項4]

項3に記載の方法により、野生型と比較して、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において比活性が向上した、改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ(PQQGDH)

[項5]

項1または3に記載の改変型PQQGDHをコードする遺伝子。

[項6]

項5に記載の遺伝子を含むベクター。

[項7]

項6に記載のベクターで形質転換された形質転換体。

[項8]

項7に記載の形質転換体を培養することを特徴とする改変型PQQGDHの製造法。

[項9]

項1または3に記載の改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキット。

[項10]

項1または3に記載の改変型PQQGDHを含むグルコースセンサー。

[項11]

項1または3に記載の改変型PQQGDHを含むグルコース測定方法。
に関するものである。

発明の効果

[0008] 本発明による改変型PQQGDHは野生型PQQGDHよりも二糖類に対する作用性が低下した酵素である。本発明による改変型PQQGDHをグルコースアッセイキット及びグルコースセンサに使用することにより、野生型PQQGDHを使用したものよりも高精度な分析が可能となったり、より安定性の高いグルコースアッセイキット及びグルコースセンサを提供することができる。

[0009] あるいは、本発明による改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素は、比活性向上により、それを用いたグルコースアッセイキットやグルコースセンサーへの酵素添加量の減量を可能にし、安価な製造を可能にする。

発明を実施するための最良の形態

[0010] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0011] 本発明の改変型PQQGDHは、野生型PQQGDHよりも二糖類に対する作用性が

低下した酵素である。

[0012] 二糖類に対する作用性とは、二糖類を脱水素する作用を意味する。二糖類としては、マルトース、シュクロース、ラクトース、セロビオースなどが例示され、特にマルトースが例示される。本願発明では、二糖類に対する作用性が低下したことを、基質特異性の向上とも表現する。

[0013] 二糖類に対する作用性が低下しているかどうかの判断は、次のように行う。

後述の試験例1に記載の活性測定法において、野生型PQQGDHを用いて、D-グルコースを基質溶液とした場合のPQQGDH活性値(a)と、D-グルコースのかわりに当該二糖類を基質溶液とした場合のPQQGDH活性値(b)を測定し、グルコースを基質とした場合の測定値を100とした場合に対する相対値 $((b)/(a) \times 100)$ を求める。次いで、改変型PQQGDHを用いて同様の操作を行い、その値を比較して判断する。

[0014] 本発明の改変型PQQGDHは、二糖類に対する作用性が野生型PQQGDHより低下していれば、グルコースに対する作用性は上昇、不変、低下のいずれであっても本発明の改変型PQQGDHに包含される。

[0015] 本発明の改変型PQQGDHは、グルコース濃度の測定において二糖類に対する作用性が野生型PQQGDHを用いた場合と比較して低下したものを含む。好ましくは、マルトースに対する作用性が低下したものである。マルトースに対する作用性は、好ましくは野生型PQQGDHの90%以下、より好ましくは75%以下、さらに好ましくは70%以下、さらに好ましくは60%以下、特に40%以下、さらに特に20%以下である。

[0016] 本発明の改変型PQQGDHは、マルトースに対する作用性がグルコースに対する作用性の90%以下であるものを含む。

[0017] 本発明の改変型PQQGDHは、野生型PQQGDHよりも二糖類に対するKm値が大きいものを含む。好ましくは、マルトースに対するKm値が大きいものである。マルトースに対するKm値は、好ましくは8mM以上、より好ましくは12mM以上、特に20mM以上である。

- [0018] 本発明の改変型PQQGDHは、二糖類に対するKm値がグルコースに対するKm値よりも大きいものを含む。好ましくは、マルトースに対するKm値がグルコースに対するKm値よりも大きいものである。あるいは、好ましくは、マルトースに対するKm値がグルコースに対するKm値の1.5倍以上、より好ましくは3倍以上である。
- [0019] 本発明の改変型PQQGDHは、野生型PQQGDHよりも二糖類に対する作用性が低下した酵素であり、さらに、野生型PQQGDHよりも安定性が向上した酵素であることが望ましい。
- [0020] 本発明における安定性(本願では、熱安定性とも表記する。)は、58℃、30分間の熱処理後の活性残存率によって評価される。本発明の改変型PQQGDHは、58℃、30分間の熱処理後の活性残存率が野生型PQQGDHよりも高いものを含む。活性残存率は、好ましくは48%以上、より好ましくは55%以上、特に好ましくは70%以上である。
- [0021] 野生型PQQGDHよりも二糖類に対する作用性が低下した本発明の改変型PQQGDHとしては、例えばAcinetobacter属由来PQQGDHのアミノ酸配列において、170位、245位、249位、349位、及び、429位からなる群から選ばれる少なくとも1つの位置のアミノ酸が置換されている、改変型PQQGDHが例示される。
- [0022] 上記のAcinetobacter属由来PQQGDHのアミノ酸配列は、好ましくはAcinetobacter calcoaceticusまたはAcinetobacter baumannii由来PQQGDHのアミノ酸配列である。中でも好ましくは配列番号1である。配列番号1で示される野生型PQQGDHタンパク質及び配列番号2で示されるその塩基配列は、アシネトバクター・バウマンニ(Acinetobacter baumannii) NCIMB11517株を起源とするものであり、特開平11-243949号公報に開示されている。なお、上記および配列番号1において、アミノ酸の表記は、シグナル配列が除かれたアスパラギン酸を1として番号付けされている。
- [0023] アシネトバクター・バウマンニ(Acinetobacter baumannii) NCIMB11517株は、以前、Acinetobacter calcoaceticusに分類されていた。
- [0024] なお、本発明の改変型PQQGDHは、グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有する限り、好ましくは二糖類に対する作用性及び／又は安定性に対して実質的な悪影響を

及ぼさない限り、さらに他のアミノ酸残基の一部が欠失または置換されていてもよく、また他のアミノ酸残基が付加されていてもよい。

- [0025] 野生型PQQGDHよりも二糖類に対する作用性が低下した本発明の改変型PQQGDHとしては、例えばAcinetobacter属由来PQQGDHのアミノ酸配列において、67位、68位、69位、76位、89位、167位、168位、169位、170位、341位、342位、343位、351位、49位、174位、188位、189位、207位、215位、245位、249位、300位、349位、129位、130位、131位及び429位の少なくとも1つの位置においてアミノ酸置換を有する、及び／または、428位と429位の間にアミノ酸が挿入されている、改変型PQQGDHが例示される。
- [0026] 基質特異性の改良された本発明の改変型PQQGDHとしては、例えばAcinetobacter属由来PQQGDHのアミノ酸配列において、アミノ酸置換を有するGDH及び428位と429位の間にアミノ酸が挿入されているGDHが例示される。
- [0027] 好ましくは、Q76N, Q76E, Q76T, Q76M, Q76G, Q76K, N167E, N167L, N167G, N167T, N167S, N167A, N167M, Q168I, Q168V, Q168A, Q168C, Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H, Q168K, Q168L, Q168M, Q168N, Q168R, Q168S, Q168W, L169D, L169S, L169W, L169Y, L169A, L169N, L169M, L169V, L169C, L169Q, L169H, L169F, L169R, L169K, L169I, L169T, L169P, L169G, L169E, A170L, A170I, A170K, A170F, A170W, A170P, A170M, K89E, K300R, S207C, N188I, T349S, K300T, L174F, K49N, S189G, F215Y, S189G, E245D, E245F, E245H, E245M, E245N, E245Q, E245V, E245C, N249G, N249A, N249E, N249Q, A351T, P67K, E68K, P67D, E68T, I69C, P67R, E68R, E129R, K130G, P131G, E129N, P131T, E129Q, K130T, P131R, E129A, K130R, P131K, E341L, M342P, A343R, A343I, E341P, M342V, E341S, M342I, A343C, M342R, A343N, T349S, T349P, T34

9Y, N429F, N429P, N429L, N429Y, A343N, L169P, L169G
及びL169Eからなる群から選ばれるアミノ酸置換のうち少なくとも1つを有する、及び
／または、428位と429位の間にL、AまたはKが挿入されている、改変型PQQGD
Hである。

[0028] 67位、68位、69位、76位、89位、167位、168位、169位、341位
、342位、343位、351位、49位、174位、188位、189位、207位、215位、245位
、300位、349位、129位、130位、131位及び429位の置換は、1ヶ所であってもよ
く、また複数箇所であってもよい。

[0029] ここで、「Q76N」は、76位のQ(Gln)をN(Asn)に置換することを意味する。

[0030] 次の段落に示すいずれかの置換、及び／または、428位と429位の間へのL、Aま
たはKの挿入は、PQQGDHの基質特異性の向上に寄与する。

[0031] Q76N, Q76E, Q76T, Q76M, Q76G, Q76K, Q168I, Q168V,
Q168A, Q168C, Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H,
Q168K, Q168L, Q168M,
Q168N, Q168R, Q168S, Q168W, L169A, L169V, L169H, L
169K, L169D, L169S, L169N, L169G, L169C, A170L, A170I
, A170K, A170F, A170W, A170P, E245F, E245H, E245M,
E245N, E245Q, E245V, E245C, N249G, N249A, N249E, N2
49Q, (Q168A+L169G+E245D), (Q168A+L169P+E245D), (K89
E+K300R), (Q168A+L169D), (Q168S+L169S), (N167E+Q168
G+L169T), (N167S+Q168N+L169R), (Q168G+L169T), (N167
G+Q168S+L169Y), (N167L+Q168S+L169G), (N167G+Q168S
+L169S+L174F+K49N), (Q168N+L168N+S189R), (N167E+Q
168G+L169A+S189G), (N167G+Q168R+L169A), (N167S+Q16
8G+L169A), (N167G+Q168V+L169S), (N167S+Q168V+L169S
) , (N167T+Q168I+L169G), (N167G+Q168W+L169N), (N167G
+Q168S+L169N), (N167G+Q168S+L169V), (Q168R+L169C),
(N167S+Q168L+L168G), (Q168C+L169S), (N167T+Q168N+

L169K), (N167G+Q168T+L169A+S207C), (N167A+Q168A+L169P), (N167G+Q168S+L169G), (N167G+Q168G), (N167G+Q168D+L169K), (Q168P+L169G), (N167G+Q168N+L169S), (Q168S+L169G), (N188I+T349S), (N167G+Q168G+L169A+F215Y), (N167G+Q168T+L169G), (Q168G+L169V), (N167G+Q168V+L169T), (N167E+Q168N+L169A), (Q168R+L169A), (N167G+Q168R), (N167G+Q168T), (N167G+Q168T+L169Q), (Q168I+L169G+K300T), (N167G+Q168A), (N167T+Q168L+L169K), (N167M+Q168Y+L169G), (N167E+Q168S), (N167G+Q168T+L169V+S189G), (N167G+Q168G+L169C), (N167G+Q168K+L169D), (Q168A+L169D), (Q168S+E245D), (Q168S+L169S), (A351T), (N167S+Q168S+L169S), (Q168I+L169Q), (N167A+Q168S+L169S), (Q168S+L169E), (Q168A+L169G), (Q168S+L169P), (P67K+E68K), (P67R+E68R+I69C), (P67D+E68T+I69C), (E129R+K130G+P131G), (E129Q+K130T+P131R), (E129N+P131T), (E129A+K130R+P131K), (E341L+M342P+A343R), (E341S+M342I), A343I, (E341P+M342V+A343C), (E341P+M342V+A343R), (E341L+M342R+A343N), (Q168A+L169A), (Q168A+L169C), (Q168A+L169E), (Q168A+L169F), (Q168A+L169H), (Q168A+L169I), (Q168A+L169K), (Q168A+L169M), (Q168A+L169N), (Q168A+L169P), (Q168A+L169Q), (Q168A+L169R), (Q168A+L169S), (Q168A+L169T), (Q168A+L169V), (Q168A+L169W)及び(Q168A+L169Y)

[0032] 野生型PQQGDHよりも熱安定性の向上した本発明のPQQGDHとしては、例えばAcinetobacter属由来PQQGDHのアミノ酸配列において、20位、76位、89位、168位、169位、245位、246位及び300位の少なくとも1つの位置においてアミノ酸置換を有する、改変型PQQGDHが例示される。

[0033] 好ましくは、K20E, Q76M, Q76G, K89E, Q168A, Q168D, Q168

E, Q168F, Q168G, Q168H, Q168M, Q168P, Q168W, Q168Y, Q168S, L169D, L169E, L169P, L169S, Q246H, K300R, Q76N, Q76T, Q76K, L169A, L169C, L169E, L169F, L169H, L169K, L169N, L169Q, L169R, L169T, L169Y及びL169Gからなる群から選ばれるアミノ酸置換を有する。20位、76位、89位、168位、169位、246位及び300位の置換は、1ヶ所であってもよく、複数ヶ所であってもよい。

[0034] ここで、「K20E」は、20位のK(Lys)をE(Glu)に置換することを意味する。

[0035] 次に示すいずれかのアミノ酸置換は、PQQGDHの熱安定性の向上に寄与する。

特に、K20E, Q76M, Q76G, (K89E + K300R), Q168A, (Q168A + L169D), (Q168S + L169S), Q246H, Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H,

Q168M, Q168P, Q168W, Q168Y, Q168S, (Q168S + L169E), (Q168S + L169P), (Q168A+L169A), (Q168A+L169C), (Q168A+L169E), (Q168A+L169F), (Q168A+L169H), (Q168A+L169K), (Q168A+L169N), (Q168A+L169P), (Q168A+L169Q), (Q168A+L169R), (Q168A+L169T), (Q168A+L169Y), (Q168A + L169G), (Q168A+L169P+E245D), (Q168A+L169G+E245D)

[0036] あるいは、野生型PQQGDHよりも二糖類に対する作用性が低下した本発明の改変型PQQGDHとしては、例えばAcinetobacter属由来PQQGDHのアミノ酸配列において、74位、146位、168位、169位、170位、245位及び342位の少なくとも1つの位置においてアミノ酸置換を有する改変型PQQGDHが例示される。

上記のうち、74位、146位の少なくとも1つの位置においてアミノ酸置換を有する改変型PQQGDHがさらに好ましい。これらの位置に変異を導入することにより、二糖類に対する作用性が低下することに加え、野生型酵素と比較してグルコースに対する反応性における比活性の向上が期待できる。また、メディエーターを含む系での反応性が向上する可能性も考えられる。

[0037] 好ましくは、D74V, S146A, Q168A, L169P, A170L, A170M, A170I, A170F, E245D, M342I, M342V, M342P, M342A, からなる群から選ばれるアミ

ノ酸置換のうち少なくとも1つを有する改変型PQQGDHである。

上記のうち、D74V、S146Aの少なくとも1つの位置においてアミノ酸置換を有する改変型PQQGDHがさらに好ましい。

[0038] ここで、「M342A」は、342位のM(Met)をA(Ala)に置換することを意味する。

[0039] 次の段落に示すいずれかの置換は、PQQGDHの基質特異性の向上に寄与する。

[0040] D74V、M342I、M342V、M342P、M342A、S146A、Q168A、L169P、A170L、A170M、A170I、A170F、(S146A+A170L)、(Q168A+L169P+A170L)、(S146A+A170M)、(Q168A+L169P+A170M)、(S146A+Q168A+L169P+A170L)、(S146A+Q168A+L169P+A170M)、(Q168A+L169P+A170L+E245D)、(Q168A+L169P+A170M+E245D)、(S146A+M342I)、(Q168A+L169P+A170L+M342I)、(Q168A+L169P+A170M+M342I)、(S146A+M342V)、(Q168A+L169P+A170L+M342V)、(Q168A+L169P+A170M+M342V)、(S146A+M342P)、(Q168A+L169P+A170L+M342P)、(Q168A+L169P+A170M+M342P)、(S146A+M342A)、(Q168A+L169P+A170L+M342A)、(Q168A+L169P+A170M+M342A)、(D74V+S146A)、(D74V+Q168A+L169P+A170L)、(D74V+Q168A+L169P+A170M)、(Q168A+L169P+A170L+E245D+M342I)、(Q168A+L169P+A170M+E245D+M342I)、(Q168A+L169P+A170L+E245D+M342V)、(Q168A+L169P+A170M+E245D+M342V)、(Q168A+L169P+A170L+E245D+M342A)、(Q168A+L169P+A170M+E245D+M342A)

上記のうち、D74V、S146Aの少なくとも1つの位置においてアミノ酸置換を有する改変型PQQGDHがさらに好ましい。

[0041] 上記のうち、本発明の改変型PQQGDHの別の態様として、さらに好ましくは、アミノ酸置換が、
A170V、A170L、A170I、A170T、A170K、A170C、A170M、A170F、A170Y、A170W、A170P、

E245D, E245F, E245H, E245M, E245N, E245Q, E245S, E245T, E245V, E245W, E245R, E245G, E245C,
N249G, N249A, N249L, N249E, N249Q,
T349S, T349P, T349Y
N429F, N429P, N429L, N429Y

からなる群から選択される改変型PQQGDHが例示される。

[0042] あるいは、本発明の改変型PQQGDHの別の態様として、好ましくは、アミノ酸置換が、

(Q168A+L169G+E245D), (Q168A+L169P+E245D)
(S146A+A170L), (Q168A+L169P+A170L), (S146A+A170M), (Q168A+L169P+A170M), (S146A+Q168A+L169P+A170L), (S146A+Q168A+L169P+A170M), (Q168A+L169P+A170L+E245D), (Q168A+L169P+A170M+E245D), (S146A+M342I), (Q168A+L169P+A170L+M342I), (Q168A+L169P+A170M+M342I), (S146A+M342V), (Q168A+L169P+A170L+M342V), (Q168A+L169P+A170M+M342V), (S146A+M342P), (Q168A+L169P+A170L+M342P), (Q168A+L169P+A170M+M342P), (S146A+M342A), (Q168A+L169P+A170L+M342A), (Q168A+L169P+A170M+M342A), (D74V+S146A), (D74V+Q168A+L169P+A170L), (D74V+Q168A+L169P+A170M), (Q168A+L169P+A170L+E245D+M342I), (Q168A+L169P+A170M+E245D+M342I), (Q168A+L169P+A170L+E245D+M342V), (Q168A+L169P+A170M+E245D+M342V), (Q168A+L169P+A170L+E245D+M342A), (Q168A+L169P+A170M+E245D+M342A)

からなる群から選択される改変型PQQGDHが例示される。

さらに好ましいものとして、(Q168A+L169P+A170L+E245D+M342I), (Q168A+L169P+E245D)が挙げられる。これらは、二糖類に対する作用性が低下しているのみならず、熱安定性にも優れており好ましい。

- [0043] 本発明の、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において比活性を向上させる方法は、野生型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素(本願明細書においてはPQQGDHとも呼称する。)のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸を欠失、置換もしくは付加することにより達成されうる。改変のもとになる野生型のPQQGDHとは、ピロロキノリンキノンを補酵素として配位し、D-グルコースを酸化してD-グルコノ-1, 5-ラク톤を生成するという反応を触媒する酵素であり、由来や構造に関しては特に限定するものではない。
- [0044] 改変のもとになる野生型のPQQGDHの起源として代表的なものが、以下に例示される微生物などである。具体的には、例えばアシネトバクター・カルコアセティカス、アシネトバクター・バウマンニ(*Acinetobacter baumannii*)、シュードモナス・エルギノサ(*Pseudomonasaeruginosa*)、シュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・フルオレッセンス(*Pseudomonas fluorescens*)、グルコノバクター・オキシダンス等の酸化細菌やアグロバクテリウム・ラジオブクター(*Agrobacterium radiobacter*)、エシェリヒア・コリ、クレブシーラ・エーロジーンズ(*Klebsiella aerogenes*)等の腸内細菌を挙げることができる。ただし、エシェリヒア・コリなどに存在する膜型酵素を改変して可溶型にすることは困難であり、起源としてはアシネトバクター属に属する微生物に由来するものを選択することが好ましい。より好ましくはアシネトバクター・カルコアセティカスもしくはアシネトバクター・バウマンニなどの可溶性PQQGDHを選択することが好ましい。
- [0045] 上記の*Acinetobacter*属由来PQQGDHのアミノ酸配列は、好ましくは*Acinetobacter calcoaceticus*または*Acinetobacter baumannii*由来PQQGDHのアミノ酸配列である。中でも好ましくは配列番号1である。配列番号1で示される野生型PQQGDHタンパク質及び配列番号2で示されるその塩基配列は、アシネトバクター・バウマンニ(*Acinetobacter baumannii*) NCIMB11517株を起源とするものであり、特開平11-243949号公報に開示されている。なお、上記および配列番号1において、アミノ酸の表記は、シグナル配列が除かれたアスパラギン酸を1として番号付けされている。
- [0046] アシネトバクター・バウマンニ(*Acinetobacter baumannii*)

NCIMB11517株は、以前、*Acinetobacter calcoaceticus*に分類されていた。

[0047] 本発明における比活性とは、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする活性測定系における、単位重量の酵素分子あたりの活性であり、より詳しくは精製酵素1mgあたりの酵素活性の単位である。

[0048] 本発明における活性中心とは、ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素において、基質であるD-グルコースが結合して触媒作用を受ける部位を言い、D-グルコースが結合する基質結合部位及び酸化触媒反応が行われるピロロキノリンキノン結合部位からなる。

[0049] さらに本発明における野生型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素とは、自然界に存在するピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素いっぱんのことである。一方、改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素とは、野生型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素と比較して、そのアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸に欠失、置換、挿入が見られるもののことである。

[0050] 本発明における比活性の向上は、一般に、野生型に対して比活性の向上が10%以上のものを含む。好ましくは野生型に対して50%以上である。

[0051] フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において、野生型PQQGDHよりも比活性が向上した本発明のPQQGDHとしては、例えば、活性中心近傍のアミノ酸を少なくとも1つ他のアミノ酸に置換することにより、野生型と比較して、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において比活性が向上した改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素がある。

[0052] フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において、野生型PQQGDHよりも比活性が向上した本発明のPQQGDHとして、さらに詳しくは活性中心から半径10オングストローム以内に存在するアミノ酸を、少なくとも1つ他のアミノ酸に置換したものであり、またそのアミノ酸が、*Acinetobacter*属由来PQQGDHのアミノ酸配列において、76位、143位、144位、163位、168位、169位、228位、229位、247位、248位、343位、346位、348位、377位、406位、408位、424位からなる群より選ばれるアミノ酸からなるものである。

[0053] また、本発明のPQQGDHとして、*Acinetobacter*属由来PQQGDHのアミノ酸配

列において、168位、169位の少なくとも1つの位置においてアミノ酸置換を有する
改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素が例示される。

[0054] 本発明のPQQGDHをさらに詳細に例示するならば、Acinetobacter属由来PQQGDHのアミノ酸配列において、Q168A、(Q168A+L169G)、(Q168A+L169C)、(Q168A+L169P)、(Q168S+L169E)、(Q168S+L169P)、からなる群から選択されるアミノ酸置換を有するピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素である。

[0055] ここで、Q168Aとは、168位のQ(Gln)をA(Ala)に置換することを意味する。

[0056] なお、本発明のPQQGDHは、グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有する限り、好ましくは、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系における比活性に対して
実質的な悪影響を及ぼさない限り、さらに他のアミノ酸残基の一部が欠失または置換されていてもよく、また他のアミノ酸残基が付加されていてもよい。

[0057] また、本発明のPQQGDHは、上記アミノ酸置換に、活性中心非近傍のアミノ酸置換を加えても、野生型と比較して、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において比活性向上が維持されている改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素でもある。

[0058] 詳しくは、245位のアミノ酸置換を組合せた改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素であり、さらに詳しくはアミノ酸置換が、(Q168A+L169G+E245D)、(Q168A+L169P+E245D)からなる群から選択されるアミノ酸置換を有するピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素である。

[0059] 本発明の、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において、ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の比活性を、野生型より向上させる方法は、当該酵素のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸を欠失、置換もしくは付加することにより、達成されうる。

[0060] 本発明の方法において、欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸は、特に限定されないが、活性中心近傍のアミノ酸であることが望ましい。あるいは、欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸は、活性中心から半径10オングストローム以内に存在するアミノ

酸であることが望ましい。

[0061] また、本発明の方法において、ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素が、*Acinetobacter*属由来PQQGDHのアミノ酸配列において、76位、143位、144位、163位、168位、169位、228位、229位、247位、248位、343位、346位、348位、377位、406位、408位、424位からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることが望ましい。

[0062] また、*Acinetobacter*属由来PQQGDHのアミノ酸配列において、168位及び169位からなる群から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることが望ましい。

[0063] さらに、*Acinetobacter*属由来PQQGDHのアミノ酸配列において、アミノ酸置換が、Q168A、(Q168A+L169G)、(Q168A+L169C)、(Q168A+L169P)、(Q168S+L169E)、(Q168S+L169P)、からなる群から選択されることが望ましい。

[0064] また、上記アミノ酸置換に、活性中心非近傍のアミノ酸置換を加えてもかまわず、その際*Acinetobacter*属由来PQQGDHのアミノ酸配列において、245位のアミノ酸であることが望ましく、さらに(Q168A+L169G+E245D)、(Q168A+L169P+E245D)からなる群から選択されることが望ましい。

[0065] ところで、本願出願時において、アシネトバクター・カルコアセチカス(*Acinetobacter calcoaceticus*) LMD79. 41株由来の酵素のX線結晶構造解析の結果が報告され、活性中心をはじめとした該酵素の高次構造が明らかとなっている(非特許文献1, 2, 3, 4を参照。)

非特許文献1: J. Mol. Biol. , 289, 319–333(1999)

非特許文献2: PNAS, 96(21), 11787–11791(1999)

非特許文献3: The EMBO Journal, 18(19), 5187–5194(1999)

非特許文献4: Protein Science, 9, 1265–1273(2000)

[0066] その高次構造に関する知見を基に、該酵素の構造と機能の相関に関する研究が進められているが、まだ完全に明らかになったとは言えない。例えば、水溶性グルコース脱水素酵素の第6番目のW-モチーフ、のBストランドとCストランドを結ぶループ

領域(W6BC)中のアミノ酸残基の構造遺伝子の特定の部位に変異を導入することによりグルコースに対する選択性を改良しうることが考察されている(例えば、特許文献2を参照。)しかしながら、効果が実証されているのは実施例に開示されているものだけである。

特許文献2:特開2001-197888

- [0067] ここで、本願発明の成果をもとにこれらの高次構造に関する知見を見直すと、二糖類に対する作用性の改変には、PQQの結合に関与するアミノ酸及び／またはその周辺のアミノ酸、グルコースの結合に関与するアミノ酸及び／またはその周辺のアミノ酸、カルシウムイオンの結合に関与するアミノ酸及び／またはその周辺のアミノ酸の少なくとも1つ以上が関わっている可能性が考えられる。
- [0068] 本発明の改変型PQQGDHは、Acinetobacter属由来PQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼ、例えば配列番号1に記載されるPQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼにおいて、PQQの結合に関与するアミノ酸及び／またはその周辺のアミノ酸、および／または、グルコースの結合に関与するアミノ酸及び／またはその周辺のアミノ酸が置換されているものを含む。非特許文献3および4には、PQQに結合するアミノ酸として、Y344、W346、R228、N229、K377、R406、R408、D424、グルコースに結合するアミノ酸としては、Q76、D143、H144、D163、Q168、L169、などの記載がある。
- [0069] また、本発明の改変型PQQGDHは、Acinetobacter属由来PQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼ、例えば配列番号1に記載されるPQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼにおいて、カルシウムイオンの結合に関与するアミノ酸及び／またはその周辺のアミノ酸が置換されているものを含む。非特許文献1には、活性中心のカルシウムイオンに結合するアミノ酸としては、P248、G247、Q246、D252、T348などの記載がある。
- [0070] また、本発明の改変型PQQGDHは、野生型酵素の活性型立体構造における活性中心から半径15 Å以内、好ましくは半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものを含む。

- [0071] また、本発明の改変型PQQGDHは、野生型酵素の活性型立体構造において基質から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものを含む。特に、基質がグルコースであるとき、野生型酵素の活性型立体構造において基質から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものが好ましい。
- [0072] また、本発明の改変型PQQGDHは、野生型酵素の活性型立体構造において基質の1位の炭素に結合するOH基から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものを含む。特に、基質がグルコースであるとき、野生型酵素の活性型立体構造において基質から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものが好ましい。
- [0073] また、本発明の改変型PQQGDHは、野生型酵素の活性型立体構造において基質の2位の炭素に結合するOH基から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものを含む。特に、基質がグルコースであるとき、野生型酵素の活性型立体構造において基質から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものが好ましい。
- [0074] 以上の教示にしたがって、当業者は、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) NCIMB11517株を起源とする配列番号1で示される野生型PQQGDHタンパク質および配列番号2で示されるその塩基配列を参照し、これらとの相同性が高い(好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有する)他の起源(天然のもの、改変されたもの、人工的に合成されたものを問わない)に由来する改変型PQQGDHについても、当該領域でアミノ酸残基を置換することにより、過度に試行錯誤を行うことなく、野生型のPQQGDHよりも二糖類に対する作用性が低下した改変型PQQGDHを得ることができる。
- [0075] あるいは、本願発明の成果をもとにこれらの高次構造に関する知見を別の観点から見直してみると、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系における比活性の向上には、1つ以上の、活性中心近傍のアミノ酸残基の置換が関わっていると考えられる。

- [0076] 本願発明において活性中心近傍とは、PQQ、グルコース及び／またはPQQに配位するカルシウムイオンとの結合に関与するアミノ酸をさし、それ以外の領域を活性中心非近傍と呼称する。
- [0077] また、本発明の改変型PQQGDHは、野生型酵素の活性型立体構造における活性中心から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものを含む。
- [0078] また、本発明の改変型PQQGDHには実質的に、野生型酵素の活性型立体構造において基質から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものを含む。特に、基質がグルコースであるとき、野生型酵素の活性型立体構造において基質から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものが好ましい。
- [0079] また、本発明の改変型PQQGDHには実質的に、野生型酵素の活性型立体構造において基質の1位の炭素に結合するOH基から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものを含む。特に、基質がグルコースであるとき、野生型酵素の活性型立体構造において基質から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものが好ましい。
- [0080] また、本発明の改変型PQQGDHには実質的に、野生型酵素の活性型立体構造において基質の2位の炭素に結合するOH基から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものを含む。特に、基質がグルコースであるとき、野生型酵素の活性型立体構造において基質から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものが好ましい。
- [0081] なお、改変箇所が複数ある場合、トータルとしての改変型を野生型と比較して、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において比活性が向上していれば、すべての改変箇所が活性中心近傍にある必要はない。
- [0082] 以上の教示にしたがって、当業者は、他の起源に由来する改変型PQQGDHについても、当該領域でアミノ酸残基を置換することにより、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において野生型のPQQGDHよりも比活性が向上したPQQGDHを得ることができる。

- [0083] 例えば、配列番号1のアミノ酸配列と、アシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) LMD79. 41株由来酵素のアミノ酸配列を比較すると、相違箇所はわずかで、相同性は92. 3% (シグナル配列含む) となり、非常に類似しているので、配列番号1におけるある残基が、他起源の酵素のどのアミノ酸残基に該当するかを容易に認識することができる。そして、本発明にしたがって、そのような1またはそれ以上の箇所においてアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で欠失、置換あるいは挿入等することにより、野生型のPQQGDHよりも二糖類に対する作用性が低下した改変型PQQGDHを得ることができる。これらの改変型PQQGDHグルコース脱水素酵素も本発明の範囲内に含まれる。
- [0084] 本発明は、上記の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子である。
- [0085] 本発明は、野生型のピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ (PQQGDH) よりも二糖類に対する作用性が低下した改変型PQQGDHをコードする遺伝子である。さらには該遺伝子を含むベクターである。さらには該ベクターで形質転換された形質転換体である。さらには、該形質転換体を培養することを特徴とする改変型PQQGDHの製造法である。
- [0086] 本発明の改変型PQQGDHをコードする遺伝子は、微生物など種々の起源より得られる野生型PQQGDHをコードする遺伝子を含むDNA断片を改変することにより得られる可能性がある。具体的には、例えばアシネトバクター・カルコアセティカス、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*)、シュードモナス・エルギノサ (*Pseudomonasaeruginosa*)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、グルコノバクター・オキシダンス等の酸化細菌やアグロバクテリウム・ラジオブクター (*Agrobacterium radiobacter*)、エシェリヒア・コリ、クレブシーラ・エーロジーンズ (*Klebsiella aerogenes*) 等の腸内細菌を挙げることができる。ただし、エシェリヒア・コリなどに存在する膜型酵素を改変して可溶型にすることは困難であり、起源としてはアシネトバクター属、さらに好ましくは相同性の高いアシネトバクター・カルコアセティカスもしくはアシネトバクター・バウマンニのいずれかの可溶性PQQGDHを選択することが好ましい。

- [0087] 野生型PQQGDHをコードする遺伝子を改変する方法としては、通常行われる遺伝情報を改変する手法が用いられる。すなわち、タンパク質の遺伝情報を有するDNAの特定の塩基を変換することにより、或いは特定の塩基を挿入または欠失させることにより、改変蛋白質の遺伝情報を有するDNAが作成される。DNA中の塩基を変換する具体的な方法としては、例えば市販のキット(Transformer Mutagenesis Kit; Clontech製, EXOIII/Mung Bean Deletion Kit; Stratagene製, QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit; Stratagene製など)の使用、或いはポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)の利用が挙げられる。
- [0088] 作製された改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAは、プラスミドと連結された状態にて宿主微生物中に移入され、改変タンパク質を生産する形質転換体となる。この際のプラスミドとしては、例えば、エシェリヒア・コリー(*Escherichia coli*)を宿主微生物とする場合にはpBluescript, pUC18などが使用できる。宿主微生物としては、例えば、エシェリヒア・コリー W3110、エシェリヒア・コリー C600、エシェリヒア・コリー JM109、エシェリヒア・コリー DH5 α などが利用できる。宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組換えDNAの移入を行なう方法などを採用することができ、更にエレクトロポレーション法を用いても良い。更には、市販のコンピテントセル(例えば、コンピテントハイJM109; 東洋紡績製)を用いても良い。
- [0089] このような遺伝子はこれらの菌株より抽出してもよく、また化学的に合成することもできる。さらに、PCR法の利用により、PQQGDH遺伝子を含むDNA断片を得ることも可能である。
- [0090] 本発明において、PQQGDHをコードする遺伝子を得る方法としては、次のような方法が挙げられる。例えばアシネトバクター・カルコアセティカス NCIB11517 の染色体を分離、精製した後、超音波処理、制限酵素処理等を用いてDNAを切断したものと、リニアな発現ベクターと両DNAの平滑末端または付着末端においてDNAリガーゼなどにより結合閉鎖させて組換えベクターを構築する。該組換えベクターを複製可能な宿主微生物に移入した後、ベクターのマーカと酵素活性の発現を指

標としてスクリーニングして、PQQを補欠分子族とするGDHをコードする遺伝子を含有する組換えベクターを保持する微生物を得る。

- [0091] 次いで、上記組換えベクターを保持する微生物を培養して、該培養微生物の菌体から該組換えベクターを分離、精製し、該発現ベクターからGDHをコードする遺伝子採取することができる。例えば、遺伝子供与体であるアシネトバクター・カルコアセティカスNCIB11517 の染色体DNAは、具体的には以下のようにして採取される。
- [0092] 該遺伝子供与微生物を例えば1〜3日間攪拌培養して得られた培養液を遠心分離により集菌し、次いで、これを溶菌させることによりPQQを補欠分子族とするGDH遺伝子の含有溶菌物を調製することができる。溶菌の方法としては、例えばリゾチーム等の溶菌酵素により処理が施され、必要に応じてプロテアーゼや他の酵素やラウリル硫酸ナトリウム(SDS)等の界面活性剤が併用される。さらに、凍結融解やフレンチプレス処理のような物理的破碎方法と組み合わせてもよい。
- [0093] 上記のようにして得られた溶菌物からDNAを分離精製するには、常法に従って、例えばフェノール処理やプロテアーゼ処理による除蛋白処理や、リボヌクレアーゼ処理、アルコール沈殿処理などの方法を適宜組み合わせることにより行うことができる。
- [0094] 微生物から分離、精製されたDNAを切断する方法は、例えば超音波処理、制限酵素処理などにより行うことができる。好ましくは特定のヌクレオチド配列に作用するII型制限酵素が適している。
- [0095] クローニングする際のベクターとしては、宿主微生物内で自律的に増殖し得るファージまたはプラスミドから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。ファージとしては、例えばエシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合にはLambda gt10、Lambda gt11などが例示される。また、プラスミドとしては、例えば、エシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、pBR322、pUC19、pBluescriptなどが例示される。
- [0096] クローニングの際、上記のようなベクターを、上述したGDHをコードする遺伝子供与体である微生物DNAの切断に使用した制限酵素で切断してベクター断片を得ることができるが、必ずしも該微生物DNAの切断に使用した制限酵素と同一の制限酵素

を用いる必要はない。微生物DNA断片とベクターDNA断片とを結合させる方法は、公知のDNAリガーゼを用いる方法であればよく、例えば微生物DNA断片の付着末端とベクター断片の付着末端とのアニーリングの後、適当なDNAリガーゼの使用により微生物DNA断片とベクターDNA断片との組換えベクターを作成する。必要に応じて、アニーリングの後、宿主微生物に移入して生体内のDNAリガーゼを利用し組換えベクターを作製することもできる。

- [0097] クローニングに使用する宿主微生物としては、組換えベクターが安定であり、かつ自律増殖可能で外来性遺伝子の形質発現できるものであれば特に制限されない。一般的には、エシェリヒア・コリW3110、エシェリヒア・コリC600、エシェリヒア・コリH B101、エシェリヒア・コリJM109、エシェリヒア・コリDH5 α などを用いることができる。
- [0098] 宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア・コリの場合には、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポレーション法などを用いることができる。
- [0099] 上記のように得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量のGDHを安定に生産し得る。宿主微生物への目的組換えベクターの移入の有無についての選択は、目的とするDNAを保持するベクターの薬剤耐性マーカーとPQQの添加によりGDH活性を同時に発現する微生物を検索すればよい。例えば、薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で生育し、かつGDHを生成する微生物を選択すればよい。
- [0100] 上記の方法により得られたPQQを補欠分子族とするGDH遺伝子の塩基配列は、Science、第214巻、1205(1981)に記載されたジデオキシ法により解読した。また、GDHのアミノ酸配列は上記のように決定された塩基配列より推定した。
- [0101] 上記のようにして、一度選択されたPQQを補欠分子族とするGDH遺伝子を保有する組換えベクターより、PQQ生産能を有する微生物にて複製できる組換えベクターへの移入は、GDH遺伝子を保持する組換えベクターから制限酵素やPCR法によりGDH遺伝子であるDNAを回収し、他のベクター断片と結合させることにより容易に実施できる。また、これらのベクターによるPQQ生産能を有する微生物の形質転

換は、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポレーション法などを用いることができる。

- [0102] PQQ生産能を有する微生物としては、メチロバクテリウム(Methylobacterium)属等のメタノール酸化性細菌、アセトバクター(Acetobacter)属やグルコノバクター(Gluconobacter)属の酢酸菌、フラボバクテリウム(Flavobacterium)属、シュードモナス属、アシネトバクター属等の細菌を挙げることができる。なかでも、シュードモナス属細菌とアシネトバクター属細菌が利用できる宿主-ベクター系が確立されており利用しやすいので好ましい。
- [0103] シュードモナス属細菌では、シュードモナス・エルギノサ、シュードモナス・フルオレッセンス、シュードモナス・プチダなどを用いることができる。また、アシネトバクター属細菌ではアシネトバクター・カルコアセティカス、アシネトバクター・バウマンニ等を用いることができる。
- [0104] 上記微生物にて複製できる組換えベクターとしては、RSF1010 由来のベクターもしくはとその類似のレプリコンを有するベクターがシュードモナス属細菌に利用可能である。例えば、pKT240、pMMB24等(M. M. Bagdasarian ら, Gene, 26, 273(1983))、pCN40、pCN60等(C. C. Nieto ら, Gene, 87, 145(1990))やpTS1137等を挙げることができる。また、pME290等(Y. Itohら, Gene, 36, 27(1985))、pNI111、pNI20C(N. Itohら, J. Biochem., 110, 614(1991))も利用できる。
- [0105] アシネトバクター属細菌では、pWM43等(W. Minas ら, Appl. Environ. Microbiol., 59, 2807(1993))、pKT230、pWH1266等(M. Hungerら, Gene, 87, 45(1990))がベクターとして利用可能である。
- [0106] こうして得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量の改変タンパク質を安定して生産し得る。形質転換体である宿主微生物の培養形態は、宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、多くの場合は液体培養で行う。工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。
- [0107] 培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、シューク

ロース、ラクトース、マルトース、ラクトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。また、窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えば、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

- [0108] 培養温度は菌が成育し、改変型PQQGDHを生産する範囲で適宜変更し得るが、上記のようなPQQ生産能を有する微生物の場合、好ましくは20〜42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、改変型PQQGDHが最高収量に達する時期を見計らって適當時期に培養を完了すればよく、通常は6〜48時間程度である。培地のpHは菌が発育し、改変型PQQGDHを生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくはpH6.0〜9.0程度の範囲である。
- [0109] 培養物中の改変型PQQGDHを生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し、利用することもできるが、一般には、常法に従って、改変型PQQGDHが培養液中に存在する場合はろ過、遠心分離などにより、改変型PQQGDH含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。改変型PQQGDHが菌体内に存在する場合には、得られた培養物からろ過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いで、この菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的で破壊し、また、必要に応じて、EDTA等のキレート剤及び界面活性剤を添加してGDHを可溶化し、水溶液として分離採取する。
- [0110] 上記のようにして得られたGDH含有溶液を、例えば減圧濃縮、膜濃縮、さらに硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、あるいは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈殿法により沈殿せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。その後、吸着剤あるいはゲルろ過剤などによるゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーを行うことにより、精製されたGDHを得ることができる。
- [0111] 例えば、セファデックス(Sephadex)ゲル(ファルマシアバイオテック)などによるゲルろ過、DEAEセファロースCL-6B (ファルマシアバイオテック)、オクチルセファロースCL-6B (ファルマシアバイオテック)等のカラムクロマトグラフィー

により分離、精製し、精製酵素標品を得ることができる。該精製酵素標品は、電気泳動(SDS-PAGE)的に単一のバンドを示す程度に純化されていることが好ましい。

[0112] 上記のようにして得られた精製酵素を、例えば凍結乾燥、真空乾燥やスプレードライなどにより粉末化して流通させることが可能である。その際、精製酵素はリン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液やGOODの緩衝液に溶解しているものを用いることができる。好適なものはGOODの緩衝液であり、なかでも、PIPES、MESもしくはMOPS緩衝液が特に好ましい。また、カルシウムイオンまたはその塩、およびグルタミン酸、グルタミン、リジン等のアミノ酸類、さらに血清アルブミン等を添加することによりGDHをより安定化することができる。

[0113] 本発明の改変タンパク質の製造方法は、特に限定されないが、以下に示すような手順で製造することが可能である。タンパク質を構成するアミノ酸配列を改変する方法としては、通常行われる遺伝情報を改変する手法が用いられる。すなわち、タンパク質の遺伝情報を有するDNAの特定の塩基を変換することにより、或いは特定の塩基を挿入または欠失させることにより、改変蛋白質の遺伝情報を有するDNAが作成される。DNA中の塩基を変換する具体的な方法としては、例えば市販のキット(Transformer Mutagenesis Kit; Clontech製, EXOIII/Mung Bean

Deletion Kit; Stratagene製, QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit; Stratagene製など)の使用、或いはポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)の利用が挙げられる。

[0114] 本発明では、配列番号1に示されるPQQGDHの76位、167位、168位、169位、170位および245位に着目し、そのアミノ酸置換体を作成したところ、基質特異性が改善されたPQQGDH改変体を得ることができた。基質特異性に関しては、Q76K, Q168A, A170P, E245D, (Q168A+L169G+E245D), (Q168A+L169P+E245D), (Q168S + L169S), (Q168A + L169D), (Q168S + E245D), (Q168S + L169E), (Q168A + L169G), (Q168S + L169P), (Q168A + L169A), (Q168A + L169C), (Q168A + L169E), (Q168A + L169K), (Q168A + L169M), (Q168A + L169N), (Q168A + L169P), (Q168A + L169S) およ

び (Q168A + L169T) が特に好ましい。

[0115] 本発明では、配列番号1に示されるPQQGDHの20位、76位、89位、168位、169位、245位、246位及び300位に着目し、そのアミノ酸置換体を作成したところ、安定性が改善されたPQQGDH改変体を得ることができた。熱安定性に関する限り、K20E, (K89E + K300R), Q168A, (Q168A + L169D), (Q168S + L169S), (Q168S + L169E), (Q168S + L169P), (Q168A + L169G), Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H, Q168M, Q168P, Q168S, Q168W, Q168Y, (Q168A + L169A), (Q168A + L169C), (Q168A + L169E), (Q168A + L169F), (Q168A + L169H), (Q168A + L169K), (Q168A + L169N), (Q168A + L169P), (Q168A + L169Q), (Q168A + L169R), (Q168A + L169T), (Q168A + L169Y), (Q168A+L169G+E245D), (Q168A+L169P+E245D) 及びQ246Hの置換が特に望ましい。

[0116] あるいは、本発明では、配列番号1に示されるPQQGDHの74位、146位、168位、169位、170位、245位及び342位に着目し、そのアミノ酸置換体を作成したところ、基質特異性が改善されたPQQGDH改変体を得ることができた。基質特異性に関しては、D74V、M342I、M342V、M342P、M342A、S146A、Q168A、L169P、A170L、A170M、A170I、A170F、(S146A+A170L)、(Q168A+L169P+A170L)、(S146A+A170M)、(Q168A+L169P+A170M)、(S146A+Q168A+L169P+A170L)、(S146A+Q168A+L169P+A170M)、(Q168A+L169P+A170L+E245D)、(Q168A+L169P+A170M+E245D)、(S146A+M342I)、(Q168A+L169P+A170L+M342I)、(Q168A+L169P+A170M+M342I)、(S146A+M342V)、(Q168A+L169P+A170L+M342V)、(Q168A+L169P+A170M+M342V)、(S146A+M342P)、(Q168A+L169P+A170L+M342P)、(Q168A+L169P+A170M+M342P)、(S146A+M342A)、(Q168A+L169P+A170L+M342A)、(Q168A+L169P+A17

0M+M342A)、(D74V+S146A)、(D74V+Q168A+L169P+A170L)、(D74V+Q168A+L169P+A170M)、(Q168A+L169P+A170L+E245D+M342I)、(Q168A+L169P+A170M+E245D+M342I)、(Q168A+L169P+A170L+E245D+M342V)、(Q168A+L169P+A170M+E245D+M342V)、(Q168A+L169P+A170L+E245D+M342A)、(Q168A+L169P+A170M+E245D+M342A)が特に好ましい。

[0117] 改変タンパク質は、液状(水溶液、懸濁液等)、粉末、凍結乾燥など種々の形態をとることができる。凍結乾燥法としては、特に制限されるものではなく常法に従って行えばよい。本発明の酵素を含む組成物は凍結乾燥物に限られず、凍結乾燥物を再溶解した溶液状態であってもよい。また、グルコース測定を行なう際には、グルコースアッセイキット、グルコースセンサーなどの種々の形態をとることができる。この様にして得られた精製された改変タンパク質は、以下のような方法により安定化することができる。

[0118] 塩化カルシウム、酢酸カルシウム、クエン酸カルシウムなどのカルシウム塩、或いはグルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸、リジンなどのアミノ酸、或いは α -ケトグルタル酸、 α -ケトグルコン酸、リンゴ酸などの有機酸、或いは血清アルブミンを単独で、または組み合わせて含有させることにより、改変タンパク質をさらに安定化することができる。

[0119] 精製された改変タンパク質に(1)アスパラギン酸、グルタミン酸、 α -ケトグルタル酸、リンゴ酸、 α -ケトグルコン酸、 α -サイクロデキストリンおよびそれらの塩からなる群から選ばれた1種または2種以上の化合物および(2)アルブミンを共存せしめることにより、改変タンパク質をさらに安定化することができる。

[0120] 凍結乾燥組成物中においては、PQQGDH含有量は、酵素の起源によっても異なるが、通常は約5〜50%(重量比)の範囲で好適に用いられる。酵素活性に換算すると、100〜2000U/mgの範囲で好適に用いられる。

[0121] アスパラギン酸、グルタミン酸、 α -ケトグルタル酸、リンゴ酸、及び α -ケトグルコン酸の塩としては、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、及びマグネシウム等の塩が挙げられるが特に限定されるものではない。上記化合物とその塩及び α -

シクロデキストリンの添加量は、1〜90%（重量比）の範囲で添加することが好ましい。これらの物質は単独で用いてもよいし、複数組み合わせてもよい。

- [0122] 含有される緩衝液としては特に限定されるものではないが、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、GOOD緩衝液などが挙げられる。該緩衝液のpHは5.0〜9.0程度の範囲で使用目的に応じて調整される。凍結乾燥物中においては緩衝剤の含有量は、特に限定されるものではないが、好ましくは0.1%（重量比）以上、特に好ましくは0.1〜30%（重量比）の範囲で使用される。
- [0123] 使用できるアルブミンとしては、牛血清アルブミン（BSA）、卵白アルブミン（OVA）などが挙げられる。特にBSAが好ましい。該アルブミンの含有量は、好ましくは1〜80%（重量比）、より好ましくは5〜70%（重量比）の範囲で使用される。
- [0124] 組成物には、さらに他の安定化剤などをPQQGDHの反応に特に悪い影響を及ぼさないような範囲で添加してもよい。本発明の安定化剤の配合法は特に制限されるものではない。例えばPQQGDHを含む緩衝液に安定化剤を配合する方法、安定化剤を含む緩衝液にPQQGDHを配合する方法、あるいはPQQGDHと安定化剤を緩衝液に同時に配合する方法などが挙げられる。
- [0125] また、カルシウムイオンを添加しても安定化効果が得られる。すなわち、カルシウムイオンまたはカルシウム塩を含有させることにより、改変タンパク質を安定化させることができる。カルシウム塩としては、塩化カルシウムまたは酢酸カルシウムもしくはクエン酸カルシウム等の無機酸または有機酸のカルシウム塩などが例示される。また、水性組成物において、カルシウムイオンの含有量は、 1×10^{-4} 〜 1×10^{-2} Mであることが好ましい。
- [0126] カルシウムイオンまたはカルシウム塩を含有させることによる安定化効果は、グルタミン酸、グルタミンおよびリジンからなる群から選択されたアミノ酸を含有させることにより、さらに向上する。
- [0127] グルタミン酸、グルタミンおよびリジンからなる群から選択されるアミノ酸は、1種または2種以上であってもよい。前記の水性組成物において、グルタミン酸、グルタミンおよびリジンからなる群から選択されたアミノ酸の含有量は、0.01〜0.2重量%であることが好ましい。

- [0128] さらに血清アルブミンを含有させてもよい。前記の水性組成物に血清アルブミンを添加する場合、その含有量は0.05〜0.5重量%であることが好ましい。
- [0129] 緩衝剤としては、通常のもので使用され、通常、組成物のpHを5〜10とするものが好ましい。具体的にはトリス塩酸、ホウ酸、グッド緩衝液が用いられるが、カルシウムと不溶性の塩を形成しない緩衝液はすべて使用できる。
- [0130] 前記の水性組成物には、必要により他の成分、例えば界面活性剤、安定化剤、賦形剤などを添加しても良い。
- [0131] 本発明は、野生型のピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ(PQQ GDH)よりも二糖類に対する作用性が低下した改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキットである。あるいは、該改変型PQQGDHを含むグルコースセンサーである。そして、該改変型PQQGDHを含むグルコース測定方法である。
- [0132] 本発明においては以下の種々の方法によりグルコースを測定することができる。

グルコースアッセイキット

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキットを特徴とする。本発明のグルコースアッセイキットは、本発明に従う改変型PQQGDHを少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明の改変型PQQGDHに加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリブレーションカーブ作製のためのグルコース標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従う改変型PQQGDHは種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で提供されるが、アポ酵素の形態で提供し、使用時にホロ化することもできる。

[0133] グルコースセンサー

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを用いるグルコースセンサーを特徴とする。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に

代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で電極上に固定化するが、アポ酵素の形態で固定化し、PQQを別の層としてまたは溶液中で提供することもできる。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明の改変型PQQGDHをカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをブロッキングする。

[0134] グルコース濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、PQQおよびCaCl₂、およびメディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の改変型PQQGDHを固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

[0135] ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素をバイオセンサーに用いる場合、そのストリップ上では、酵素は検体の血液により溶解されることになるが、血液は、水や他の一般的な試薬に用いられる溶媒と比較して、粘度が高く、溶解性が低いので、ストリップ上に添加する酵素量は、タンパク量として少ない方がより望ましい。

本願発明の方法によれば、本願発明のピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の比活性は1より大きい酵素が得られる。好ましくは1.1以上、より好ましくは1.5以上のものが得られる。

比活性が高いと、タンパク質としての添加量が少なくて済むため、本願発明のグルコースセンサーは、既述の安定化剤等の添加量の上限制約が低減され、より高い安定性を確保できる可能性を高められる。

実施例

[0136] 以下、本発明を実施例に基づきより詳細に説明する。

[0137] 実施例1 : PQQ依存性グルコース脱水素酵素遺伝子の発現プラスミドの構築

野生型PQQ依存性グルコース脱水素酵素の発現プラスミドpNPG5は、ベクターp

Bluescript SK(−)のマルチクローニング部位にアシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) NCIMB11517株由来のPQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする構造遺伝子を挿入したものである。その塩基配列を配列表の配列番号2に、また該塩基配列から推定されるPQQ依存性グルコース脱水素酵素のアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

[0138] 実施例2:変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素の作製

野生型PQQ依存性グルコース脱水素酵素遺伝子を含む組換えプラスミドpNPG5と配列番号3記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE製)を用いて、そのプロトコールに従って変異処理操作を行い、更に塩基配列を決定して、配列番号1記載のアミノ酸配列の76番目のグルタミンがアスパラギンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M1)を取得した。

pNPG5と配列番号4記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の76番目のグルタミンがグルタミン酸に置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコー

ドする組換えプラスミド(pNPG5M2)を取得した。

pNPG5と配列番号5記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の76番目のグルタミンがスレオニンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M3)を取得した。

pNPG5と配列番号6記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の76番目のグルタミンがメチオニンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M4)を取得した。

pNPG5と配列番号7記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の76番目

のグルタミンがグリシンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M5)を取得した。

pNPG5と配列番号8記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の76番目のグルタミンがリジンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M6)取得した。

pNPG5と配列番号9記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがイソロイシンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M7)を取得した。

pNPG5と配列番号10記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがバリンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M8)を取得した。

pNPG5と配列番号11記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがアラニンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M9)を取得した。

pNPG5と配列番号22記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の20番目のリジンがグルタミン酸に置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M10)を取得した。

pNPG5と配列番号23記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の89番目のリジンがグルタミン酸に置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミドを取得した。更にこのプラスミドと配列番号24記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の89番目のリジンがグルタミン酸に、300番

目のリジンがアルギニンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M11)を取得した。

pNPG5と配列番号25記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の246番目のグルタミンがヒスチジンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M12)を取得した。

pNPG5と配列番号26記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがセリンに、169番目のロイシンがセリンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M13)を取得した。

pNPG5と配列番号27記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがアラニンに、169番目のロイシンがアスパラギン酸に置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M14)を取得した。

pNPG5と配列番号66記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがセリンに、169番目のロイシンがグルタミン酸に置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M15)を取得した。

pNPG5と配列番号67記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがセリンに、169番目のロイシンがプロリンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M16)を取得した。

pNPG5と配列番号68記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の168

番目のグルタミンがアラニンに、169番目のロイシンがグリシンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M17)を取得した。

pNPG5、pNPG5M1、pNPG5M2、pNPG5M3、pNPG5M4、pNPG5M5、pNPG5M6、pNPG5M7、pNPG5M8、pNPG5M9、pNPG5M10、pNPG5M11、pNPG5M12、pNPG5M13、pNPG5M14、pNPG5M15、pNPG5M16、pNPG5M17の各組換えプラスミドで大腸菌コンピテントセル(エシェリヒア・コリーJM109;東洋紡績製)を形質転換し、該形質転換体をそれぞれ取得した。

[0139] 実施例3:シュードモナス属細菌で複製できる発現ベクターの構築

実施例2で得た組換えプラスミドpNPG5M1のDNA5 μ gを制限酵素BamHIおよびXhoI(東洋紡績製)で切断して、変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素の構造遺伝子部分を単離した。単離したDNAとBamHIおよびXhoIで切断したpTM33(1 μ g)とをT4DNAリガーゼ1単位で16℃、16時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAはエシェリヒア・コリDH5 α のコンピテントセルを用いて形質転換を行った。得られた発現プラスミドをpNPG6M1と命名した。

pNPG5、pNPG5M2、pNPG5M3、pNPG5M4、pNPG5M5、pNPG5M6、pNPG5M7、pNPG5M8、pNPG5M9、pNPG5M10、pNPG5M11、pNPG5M12、pNPG5M13、pNPG5M14、pNPG5M15、pNPG5M16、pNPG5M17の各組換えプラスミドについても上記方法と同様にして発現プラスミドを取得した。得られた発現プラスミドそれぞれpNPG6、pNPG6M2、pNPG6M3、pNPG6M4、pNPG6M5、pNPG6M6、pNPG6M7、pNPG6M8、pNPG6M9、pNPG6M10、pNPG6M11、pNPG6M12、pNPG6M13、pNPG6M14、pNPG6M15、pNPG6M16、pNPG6M17と命名した。

[0140] 実施例4:シュードモナス属細菌の形質転換体の作製

シュードモナス・プチダTE3493(微工研寄12298号)をLBG培地(LB培地+0.3%グリセロール)で30℃、16時間培養し、遠心分離(12,000rpm、10分間)により菌体を回収し、この菌体に氷冷した300mMシュウクロースを含む5mMKーリン酸緩衝液(pH7.0)8mlを加え、菌体を懸濁した。再度遠心分離(12,000rpm、10分間

)により菌体を回収し、この菌体に氷冷した300mMシ
ュークロースを含む5mMK-リン酸緩衝液(pH7. 0)0. 4mlを加え、菌体を懸濁した
。

該懸濁液に実施例3で得た発現プラスミドpNPG6M1を0. 5 μ g加え、エレクトロポ
レーション法により形質転換した。100 μ g/mlのストレプトマイシンを含むLB寒天培
地に生育したコロニーより、目的とする形質転換体を得た。

pNPG6、pNPG6M2、pNPG6M3、pNPG6M4、pNPG6M5、pNPG6M6、pN
PG6M7、pNPG6M8、pNPG6M9、pNPG6M10、pNPG6M11、pNPG6M12
、pNPG6M13、pNPG6M14、pNPG6M15、pNPG6M16、pNPG6M17の各
発現プラスミドについても上記方法と同様にして、該形質転換体をそれぞれ取得した
。

[0141] 試験例1

GDH活性の測定方法(比活性測定以外に使用)

測定原理

D-グルコース + PMS + PQQGDH \rightarrow D-グルコノ-1, 5-ラクトン + PMS(re
d)

2PMS(red) + NTB \rightarrow 2PMS + ジホルマザン

フェナジンメトサルフェート(PMS)(red)によるニトロテトラゾリウムブルー(NTB)の
還元により形成されたジホルマザンの存在は、570nmで分光光度法により測定した
。

単位の定義

1単位は、以下に記載の条件下で1分当たりジホルマザンを0. 5ミリモル形成させる
PQQGDHの酵素量をいう。

(3) 方法

試薬

A. D-グルコース溶液: 0. 5M(0. 9g D-グルコース(分子量180. 16)/10ml
H₂O)

B. PIPES-NaOH緩衝液, pH6. 5: 50mM(60mLの水中に懸濁した1. 51g

のPIPES(分子量302.36)を、5N NaOHに溶解し、2.2mlの10% Triton X-100を加える。5N NaOHを用いて25℃でpHを6.5±0.05に調整し、水を加えて100mlとした。)

C. PMS溶液:3.0mM(9.19mgのフェナジンメトサルフェート(分子量817.65)／10mlH₂O)

D. NTB溶液:6.6mM(53.96mgのニトロテトラゾリウムブルー(分子量817.65)／10mlH₂O)

E. 酵素希釈液:1mM CaCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.1% BSAを含む50mM PIPES-NaOH緩衝液(pH6.5)

手順

遮光ビンに以下の反応混合物を調製し、氷上で貯蔵した(用時調製)

1. 8ml D-グルコース溶液 (A)
- 24.6ml PIPES-NaOH緩衝液(pH6.5) (B)
- 2.0ml PMS溶液 (C)
- 1.0ml NTB溶液 (D)

[0142] [表1]

アッセイ混合物中の濃度		
PIPES 緩衝液	42	mM
D-グルコース	30	mM
PMS	0.20	mM
NTB	0.22	mM

[0143] 3.0mlの反応混合液を試験管(プラスチック製)に入れ、37℃で5分間予備加温した。

0.1mlの酵素溶液を加え、穏やかに反転して混合した。

570nmでの水に対する吸光度の増加を37℃に維持しながら分光光度計で4〜5分間記録し、曲線の初期直線部分からの1分当たりのΔODを計算した(ODテスト)。

同時に、酵素溶液に代えて酵素希釈液(E)加えることを除いては同一の方法を繰

り返し、ブランク(Δ ODブランク)を測定した。

アッセイの直前に氷冷した酵素希釈液(E)で酵素粉末を溶解し、同一の緩衝液で0.1–0.8U/mlに希釈した(該酵素の接着性のためにプラスチックチューブの使用が好ましい)。

計算

活性を以下の式を用いて計算する:

$$U/ml = \{ \Delta OD / \min(\Delta OD_{\text{テスト}} - \Delta OD_{\text{ブランク}}) \times V_t \times df \} / (20.1 \times 1.0 \times V_s)$$

$$U/mg = (U/ml) \times 1/C$$

V_t : 総体積 (3.1ml)

V_s : サンプル体積 (1.0ml)

20.1: ジホルマザンの1/2ミリモル分子吸光係数

1.0: 光路長 (cm)

df : 希釈係数

C : 溶液中の酵素濃度 (c mg/ml)

[0144] ホロ型発現精製酵素の調製方法(本項は実施例1–14にのみ適用)

500mlのTerrific brothを2L容坂口フラスコに分注し、121℃、20分間オートクレーブを行い、放冷後別途無菌濾過したストレプトマイシンを100 μ g/mlになるように添加した。この培地に100 μ g/mlのストレプトマイシンを含むPY培地で予め30℃、24時間培養したシュードモナス・プチダTE3493(pNPG6M1)の培養液を5ml接種し、30℃で40時間通気攪拌培養した。培養終了時のPQQ依存性グルコース脱水素酵素活性は、前記活性測定において、培養液1ml当たり約120U/mlであった。

上記菌体を遠心分離により集菌し、20mMリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁した後、超音波処理により破碎し、更に遠心分離を行い、上清液を粗酵素液として得た。得られた粗酵素液をHiTrap-SP(アマシャム-ファルマシア)イオン交換カラムクロマトグラフィーにより分離・精製した。次いで10mM PIPES-NaOH緩衝液(pH6.5)で透析した後に終濃度が1mMになるように塩化カルシウムを添加した。最後にHiTra

p-DEAE(アマシヤム-ファルマシア)イオン交換カラムクロマトグラ

フィーにより分離・精製し、精製酵素標品を得た。本方法により得られた標品は、SD S-PAGE的にはほぼ単一なバンドを示した。

pNPG6、pNPG6M2、pNPG6M3、pNPG6M4、pNPG6M5、pNPG6M6、pNPG6M7、pNPG6M8、pNPG6M9、pNPG6M10、pNPG6M11、pNPG6M12、pNPG6M13、pNPG6M14、pNPG6M15、pNPG6M16、pNPG6M17によるシュードモナス・プチダTE3493形質転換体についても上記方法と同様にして精製酵素標品を取得した。

このようにして取得した精製酵素を用いて性能を評価した。

[0145] Km値の測定

上記の活性測定方法に従い、PQQGDHの活性を測定した。グルコースに対するKm値の測定は、上記活性測定方法の基質濃度を変化させて実施した。また、マルトースに対するKm値の測定は、上記活性測定方法のグルコース溶液をマルトース溶液に置き換え、グルコースに対するKm値の測定同様基質濃度を変化させて実施した。結果を表2A表2B、表6、表9及び表14に示す。

[0146] 基質特異性(本項は実施例1〜14にのみ適用)

上記の活性測定方法に従い、PQQGDHの活性を測定した。グルコースを基質溶液とした場合の脱水素酵素活性値とマルトースを基質溶液とした場合の脱水素酵素活性値を測定し、グルコースを基質とした場合の測定値を100とした場合の相対値を求めた。マルトースを基質溶液とした場合の脱水素酵素活性に際しては、0.5Mのマルトース溶液を調製して活性測定に用いた。結果を表2A、表2B、表4、表5、表6、表8、表9、表11、表13及び表14に示す。

[0147] 熱安定性の測定

各種PQQGDHを酵素濃度5U/ml、緩衝液(1mM CaCl₂、1μM PQQを含む10mM PIPES-NaOH(pH6.5)中で保存し、58℃で熱処理後の活性残存率を求めた。結果を表2A、表2B、表6、表9及び表14に示す。なお、熱処理を行なった時間は、表2Bの試験のみ30分間、その他の試験は20分間である。

[0148] 至適pHの測定

0.22% Triton-X100を含む 50mMリン酸緩衝液(pH5.0ー8.0)、0.22% Triton-X100を含む50mM 酢酸緩衝液(pH3.0ー6.0)、0.22% Triton-X100を含む50mM PIPES-NaOH緩衝液(pH6.0ー7.0)、0.22% Triton-X100を含む50mM

トリス塩酸緩衝液(pH7.0ー9.0)中で酵素活性を測定した。結果を図1に示す。また、最も高い活性を示したpHを表2Aに示す。本表において、比活性は、酵素活性(U/mL)/A280nmの吸光度(ABS)で示される。また、Km(Mal)は、マルトースに対するKm値(mM)を、Km(Glc)は、グルコースに対するKm値(mM)をそれぞれ示す。

[0149] [表2]

A						
変異	比活性	基質特異性	Km(Mal)	Km(Glc)	至適pH	熱安定性
Q76N	49	66%	13.6	3.1	6.4	49.1%
Q76E	36	68%	13.6	3.7	5.6	42.5%
Q76T	32	84%	10.3	2.5	6.4	49.0%
Q76M	108	81%	8.7	2.2	6.4	55.3%
Q76G	32	84%	10.6	2.2	6.4	58.5%
Q76K	84	32%	29.9	7.9	6.8	48.4%
Q168I	231	69%	11.9	5.3	6.8	27.3%
Q168V	377	71%	13	6.4	6.4	32.2%
Q168A	333	37%	35.3	10.4	6.4	59.2%
野生型	1469	103%	4.1	6.5	6.4	46.7%
B						
変異	比活性	基質特異性				熱安定性
K20E	924	105%				49.7%
Q76M	108	81%				52.3%
Q76G	32	84%				55.1%
K89E + K300R	1038	81%				58.8%
Q168A	333	37%				55.8%
Q246H	686	192%				82.2%
Q168S+L169S	288	33%				73.0%
Q168A+L169D	106	18%				78.8%
Q168S+L169E	270	19%				47.0%
Q168S+L169P	460	25%				47.2%
Q168A+L169G	170	18%				78.3%
野生型	1469	103%				43.4%

[0150] Q76Kのグルコース定量性の確認

0.45U/mlのQ76Kを含んだ下記反応試薬を調整した。

50mM PIPES-NaOH緩衝液(pH6.5)

1mM CaCl₂

0.22% Triton-X100

0. 4mM PMS

0. 26mM WST-1 (水溶性テトラゾリウム塩、同仁化学研究所製)

下記に示すグルコース量の測定方法に従い、試料として精製水、100mg/dl標準液及びグルコース水溶液(600mg/dl)の10水準の希釈系列を測定し、直線性を確認した。

結果を図2に示した。

[0151] グルコース量の測定方法

試料量3 μ lに試薬300 μ lを加え、試薬添加後2分後からの1分間における吸光度変化を求め、精製水及びグルコース100mg/dl標準液での2点検量線に基づき試料中のグルコース量を求めた。尚、測定装置は日立7150形自動分析装置を使用し、測定波長は、主波長480nmのみ、測定温度は37℃で実施した。

図2より、0-600mg/dlの範囲で良好な直線性が確認された。

[0152] Q76Kのマルトース作用性の確認

0. 45U/mlのQ76Kを含んだ下記反応試薬を調整した。

50mM PIPES-NaOH緩衝液(pH6. 5)

1mM CaCl₂

0. 22% Triton-X100

0. 4mM PMS

0. 26mM WST-1 (同仁化学研究所製)

サンプルとしては100mg/dlまたは300mg/dlのグルコースをベースに0, 120, 240, 360mg/dlのマルトースを上乗せした物を準備した。上記、グルコース量の測定方法に従い、測定を実施した。

マルトースを含まない100mg/dlグルコース溶液と100とし、ベースに100mg/dlのグルコースを含むサンプルの測定値をそれぞれ相対評価した。同様にマルトースを含まない300mg/dlグルコース溶液と100とし、ベースに300mg/dlのグルコースを含むサンプルの測定値をそれぞれ相対評価した。結果を図3に示す。

[0153] Q76Eのマルトース作用性の確認

Q76Kのマルトース作用性の確認同様にQ168Eを用いて作用性を評価した。酵

素は、0.24U/mlの濃度で添加した。結果を図4に示す。

[0154] Q168Vのマルトース作用性の確認

Q76Kのマルトース作用性の確認同様にQ168Vを用いて作用性を評価した。酵素は、0.35U/mlの濃度で添加した。結果を図5に示す。

[0155] Q168Aのマルトース作用性の確認

Q76Kのマルトース作用性の確認同様にQ168Aを用いて作用性を評価した。酵素は、0.6U/mlの濃度で添加した。結果を図6に示す。

[0156] 野生型酵素のマルトース作用性の確認

Q76Kのマルトース作用性の確認同様に野生型酵素を用いて作用性を評価した。酵素は、0.1U/mlの濃度で添加した。結果を図7に示す。

図3、図4、図5、図6、図7より、Q76K、Q76E、Q168V及びQ168Aは野生型酵素に比べ、マルトースに対する作用性が低下していることが確認された。

[0157] 実施例5:変異ライブラリーの構築とスクリーニング

発現プラスミドpNPG5をテンプレートとして、PCR法により構造遺伝子中の167-169領域にランダム変異を導入した。PCR反応は表3に示す組成の溶液中で、98℃2分間、次に、98℃20秒間、60℃30秒間、及び72℃4分間を30サイクルの条件で行った。

[0158] [表3]

試薬	液量
KOD Dash DNAポリメラーゼ (2.5U/μl)	1.0μl
テンプレートDNA	1.0μl
フォワードプライマー (配列番号12に記載)	2.5μl
リバースプライマー (配列番号13に記載)	2.5μl
10× buffer	5.0μl
2mM dNTPs	5.0μl
H ₂ O	33.0μl

[0159] 得られた変異ライブラリーを大腸菌DH5αに形質転換し、形成された各コロニーを180μl/wellのLB培地(100μg/mlのアンピシリンと26μMのPQQを含む)の分注されたマイクロタイタープレートに植菌し、37℃、24時間培養した。培養液各50μlを別のマイクロタイタープレートに移し、凍結融解の繰り返しによって培養菌体を破

砕した後、遠心分離(2000rpm、10分間)を行い、上清を回収した。回収した上清を2枚のマイクロタイタープレートに各10 μ l分注した。1枚のマイクロタイタープレートはグルコースを基質とした活性測定試薬を用いて活性測定し、もう一枚はマルトースを基質とした活性測定試薬を用いて活性測定し、反応性を比較した。マルトースに対する反応性の变化したクローンが多数得られた。

マルトースに対する反応性の变化したクローンをLB培地(100 μ g/mlのアンピシリンと26 μ MのPQQを含む) 5mlの分注された試験管で培養し、確認実験を行ったところ、マルトースに対する反応性の变化したクローンが多数得られた。

結果を表4に示す。

[0160] [表4]

変異箇所	マルトース作用性	変異箇所	マルトース作用性
N167E+Q168G+L169T	6 4 %	N167S+Q168N+L169R	8 0 %
Q168G+L169T	4 2 %	N167G+Q168S+L169Y	5 5 %
N167L+Q168S+L169G	4 5 %	N167G+Q168S+L169S+L174F+K49N	3 9 %
Q168N+L169N+S189R	5 1 %	N167E+Q168G+L169A+S189G	5 8 %
N167G+Q168R+L169A	6 6 %	N167S+Q168G+L169A	4 8 %
N167G+Q168V+L169S	4 2 %	N167S+Q168V+L169S	7 1 %
N167T+Q168I+L169G	4 2 %	N167G+Q168W+L169N	7 2 %
N167G+Q168S+L169N	5 0 %	N167G+Q168S+L169V	3 6 %
Q168R+L169C	2 9 %	N167S+Q168L+L169G	4 1 %
Q168C+L169S	3 3 %	N167T+Q168N+L169K	6 8 %
N167G+Q168T+L169A+S207C	2 4 %	N167A+Q168A+L169P	6 3 %
N167G+Q168S+L169G	3 4 %	N167G+Q168G	4 6 %
N167G+Q168D+L169K	3 5 %	Q168P+L169G	2 3 %
N167G+Q168N+L169S	5 9 %	Q168S+L169G	2 2 %
N188I+T349S	6 4 %	N167G+Q168G+L169A+F215Y	3 2 %
N167G+Q168T+L169G	2 8 %	Q168G+L169V	4 3 %
N167G+Q168V+L169T	4 3 %	N167E+Q168N+L169A	5 2 %
Q168R+L169A	7 2 %	N167G+Q168R	2 3 %
N167G+Q168T	6 9 %	N167G+Q168T+L169Q	7 2 %
Q168I+L169G+K300T	2 4 %	N167G+Q168A	3 3 %
N167T+Q168L+L169K	6 3 %	N167M+Q168Y+L169G	6 0 %
N167E+Q168S	3 2 %	N167G+Q168T+L169V+S189G	4 2 %
N167G+Q168G+L169C	3 7 %	N167G+Q168K+L169D	4 1 %
Q168A+L169D	1 6 %	Q168S+E245D	2 9 %
Q168S+L169S	2 6 %	A351T	7 4 %
N167S+Q168S+L169S	5 1 %	Q168I+L169Q	5 1 %
N167A+Q168S+L169S	4 0 %	Q168A	3 5 %
Q168S+L169P	2 0 %	Q168A+L169G	1 6 %
Q168S+L169E	1 5 %		

[0161] 同様にして67-69領域(フォワードプライマー:配列番号14に記載、リバーズプライマー:配列番号15に記載を使用)、129-131領域(フォワードプライマー:配列番号16に記載、リバーズプライマー:配列番号17に記載を使用)、341-343領域(フォワードプライマー:配列番号18に記載、リバーズプライマー:配列番号19に記載を使用)にも変異導入した。また、428と429(フォワードプライマー:配列番号20に記載、リバーズプライマー:配列番号21に記載を使用)の間に挿入を試みた。

結果を表5に示す。

[0162] [表5]

67-69領域	変異箇所	マルトース作用性	変異箇所	マルトース作用性
	P67K+E68K	79%	P67R+E68R+I69C	80%
	P67D+E68T+I69C	60%		
129-131領域	変異箇所	マルトース作用性	変異箇所	マルトース作用性
	E129R+K130G+P131G	73%	E129Q+K130T+P131R	80%
	E129N+P131T	67%	E129A+K130R+P131K	70%
341-343領域	変異箇所	マルトース作用性	変異箇所	マルトース作用性
	E341L+M342P+A343R	80%	E341S+M342I	80%
	A343I	45%	E341P+M342V+A343C	50%
	E341P+M342V+A343R	76%	E341L+M342R+A343N	51%
428と429の間に挿入	挿入アミノ酸	マルトース作用性	挿入アミノ酸	マルトース作用性
	L	73%	A	71%
	K	79%		

[0163] これらのうち、マルトースに対する作用性が大きく低下している変異体を選抜(Q168S+E245D、Q168A+L169D、Q168S+L169S、Q168S+L169E、Q168A+L169G、Q168S+L169P)し、これらの変異体からプラスミドを抽出し、実施例3並びに実施例4記載の方法に準じてシュードモナスを形質転換してホロ型酵素を発現し、精製酵素を取得して特性を評価した。結果を表6に示す。表6において、比活性は、酵素活性(U/ml)/A280nmの吸光度で示される。

[0164] [表6]

変異	比活性	基質特異性	Km(Mal)	Km(Glc)	熱安定性
Q168S+E245D	714	29%	24.3	14.4	55.5%
Q168A+L169D	106	18%	65.9	20.8	89.4%
Q168S+L169S	288	33%	55.1	14.4	83.9%
Q168S+L169P	460	25%	87.1	24.1	76.3%
Q168A+L169G	170	18%	60.4	18.6	89.5%
Q168S+L169E	270	19%	70.7	8.9	63.3%
Q168A	313	43%			64.4%
野生型	1469	110%			59.8%

[0165] 実施例6:Q168部位の変異による基質特異性への影響

実施例5に記載の方法に準じて、Q168C、Q168D、Q168E、Q168F、Q168G、Q168H、Q168K、Q168L、Q168M、Q168N、Q168P、Q168R、Q168S、Q168T、Q168W、Q168Yの各変異体を調製した。各変異体の調製に使用したプラ

イマーを表7に示す。また、調製した各変異体を用い、試験管培養にて調製した破碎液でマルトースに対する反応性を比較した結果を表8に示す。更に、各変異体からプラスミドを抽出し、実施例3並びに実施例4記載の方法に準じてシュドモナスを形質転換してホロ型酵素を発現し、精製酵素を取得して特性を評価した。結果を表9に示す。表9において、比活性は、酵素活性(U/ml)/A280nmの吸光度 で示される。

[0166] [表7]

変異箇所	フォワード プライマー	リバース プライマー
Q 1 6 8 C	配列番号 2 2	配列番号 2 3
Q 1 6 8 D	配列番号 2 2	配列番号 2 4
Q 1 6 8 E	配列番号 2 2	配列番号 2 5
Q 1 6 8 F	配列番号 2 2	配列番号 2 6
Q 1 6 8 G	配列番号 2 2	配列番号 2 7
Q 1 6 8 H	配列番号 2 2	配列番号 2 8
Q 1 6 8 K	配列番号 2 2	配列番号 2 9
Q 1 6 8 L	配列番号 2 2	配列番号 3 0
Q 1 6 9 M	配列番号 2 2	配列番号 3 1
Q 1 6 8 N	配列番号 2 2	配列番号 3 2
Q 1 6 8 P	配列番号 2 2	配列番号 3 3
Q 1 6 8 R	配列番号 2 2	配列番号 3 4
Q 1 6 8 S	配列番号 2 2	配列番号 3 5
Q 1 6 8 T	配列番号 2 2	配列番号 3 6
Q 1 6 8 W	配列番号 2 2	配列番号 3 7
Q 1 6 8 Y	配列番号 2 2	配列番号 3 8

[0167] [表8]

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
Q 1 6 8 C	5 4 %	Q 1 6 9 M	6 4 %
Q 1 6 8 D	2 9 %	Q 1 6 8 N	8 2 %
Q 1 6 8 E	3 6 %	Q 1 6 8 P	1 0 3 %
Q 1 6 8 F	4 3 %	Q 1 6 8 R	3 6 %
Q 1 6 8 G	4 6 %	Q 1 6 8 S	6 0 %
Q 1 6 8 H	5 5 %	Q 1 6 8 T	9 4 %
Q 1 6 8 K	8 3 %	Q 1 6 8 W	8 7 %
Q 1 6 8 L	9 2 %	Q 1 6 8 Y	9 3 %
野生型	1 0 4 %		

[0168] [表9]

変異	比活性	基質特異性	Km(Mal)	Km(Glc)	熱安定性
Q 1 6 8 C	55	5 8 %	20.4	10.7	18.2%
Q 1 6 8 D	102	4 6 %	27.4	—	61.4%
Q 1 6 8 E	110	5 1 %	4.7	8.6	75.4%
Q 1 6 8 F	137	5 2 %	36.4	10.3	55.5%
Q 1 6 8 G	667	7 8 %	11.1	—	78.7%
Q 1 6 8 H	486	5 8 %	10.2	5.4	76.0%
Q 1 6 8 K	5	8 0 %	9.6	2.2	—
Q 1 6 8 L	110	9 6 %	8.6	4.3	37.1%
Q 1 6 9 M	190	6 8 %	22.7	5.3	78.4%
Q 1 6 8 N	68	9 3 %	3.6	4.1	—
Q 1 6 8 P	128	1 0 6 %	3.5	5.1	82.3%
Q 1 6 8 R	57	6 0 %	18.4	3.8	32.9%
Q 1 6 8 S	483	8 1 %	12.5	3.7	80.1%
Q 1 6 8 T	11	1 0 3 %	15.0	6.9	—
Q 1 6 8 W	287	9 6 %	5.3	3.2	59.2%
Q 1 6 8 Y	297	9 9 %	12.1	6.9	100.0%
野生型	1285	1 0 6 %	3.8	6.3	52.2%

[0169] 実施例7:L169部位の変異による基質特異性への影響

実施例2に記載の方法に準じて、L169A, L169V, L169H, L169Y, L169K, L169D, L169S, L169N, L169G, L169Cの各変異体を調製した。各変異体の調製に使用したプライマーを表10に示す。また、調製した各変異体を用い、試験管培養にて調製した破碎液でマルトースに対する反応性を比較した結果を表11に示す。

[0170] [表10]

変異箇所	フォワード プライマー	リバースプライマー
L 1 6 9 A	配列番号 3 9	配列番号 3 9 と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L 1 6 9 V	配列番号 4 0	配列番号 4 0 と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L 1 6 9 Y	配列番号 4 1	配列番号 4 1 と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L 1 6 9 H	配列番号 4 2	配列番号 4 2 と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L 1 6 9 K	配列番号 4 3	配列番号 4 3 と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L 1 6 9 D	配列番号 4 4	配列番号 4 4 と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L 1 6 9 S	配列番号 4 5	配列番号 4 5 と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L 1 6 9 N	配列番号 4 6	配列番号 4 6 と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L 1 6 9 G	配列番号 4 7	配列番号 4 7 と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L 1 6 9 C	配列番号 4 8	配列番号 4 8 と相補的な合成オリゴヌクレオチド

[0171] [表11]

変異箇所	マルトース作 用性	変異箇所	マルトース作 用性
L 1 6 9 A	5 9 %	L 1 6 9 D	3 8 %
L 1 6 9 V	7 8 %	L 1 6 9 S	5 7 %
L 1 6 9 Y	1 0 7 %	L 1 6 9 N	7 4 %
L 1 6 9 H	8 5 %	L 1 6 9 G	4 8 %
L 1 6 9 K	6 0 %	L 1 6 9 C	5 7 %
野生型	9 7 %		

[0172] 実施例8: Q168A変異体に対するL169部位の変異の組み合わせによる基質特異性への影響

実施例5に記載の方法に準じて、Q168A+L169A、Q168A+L169C、Q168A

+L169E、Q168A+L169F、Q168A+L169H、Q168A+L169I、Q168A+L169K、Q168A+L169M、Q168A+L169N、Q168A+L169P、Q168A+L169Q、Q168A+L169R、Q168A+L169S、Q168A+L169T、Q168A+L169V、Q168A+L169W、Q168A+L169Yの各変異体を調製した。各変異体の調製に使用したプライマーを表12に示す。また、調製した各変異体を用い、試験管培養にて調製した破碎液でマルトースに対する反応性を比較した結果を表13に示す。更に、各変異体からプラスミドを抽出し、実施例3並びに実施例4記載の方法に準じてシュードモナスを形質転換してホロ型酵素を発現し、精製酵素を取得して特性を評価した。結果を表14に示す。表14において、比活性は、酵素活性(U/ml)/A280nmの吸光度で示される。

[0173] [表12]

変異箇所	フォワード プライマー	リバー プライマー
Q168A+L169A	配列番号 1 2	配列番号 4 9
Q168A+L169C	配列番号 1 2	配列番号 5 0
Q168A+L169E	配列番号 1 2	配列番号 5 1
Q168A+L169F	配列番号 1 2	配列番号 5 2
Q168A+L169H	配列番号 1 2	配列番号 5 3
Q168A+L169I	配列番号 1 2	配列番号 5 4
Q168A+L169K	配列番号 1 2	配列番号 5 5
Q168A+L169M	配列番号 1 2	配列番号 5 6
Q168A+L169N	配列番号 1 2	配列番号 5 7
Q168A+L169P	配列番号 1 2	配列番号 5 8
Q168A+L169Q	配列番号 1 2	配列番号 5 9
Q168A+L169R	配列番号 1 2	配列番号 6 0
Q168A+L169S	配列番号 1 2	配列番号 6 1
Q168A+L169T	配列番号 1 2	配列番号 6 2
Q168A+L169V	配列番号 1 2	配列番号 6 3
Q168A+L169W	配列番号 1 2	配列番号 6 4
Q168A+L169Y	配列番号 1 2	配列番号 6 5

[0174] [表13]

変異箇所	マルトース作用性	変異箇所	マルトース作用性
Q168A+L169A	19%	Q168A+L169P	24%
Q168A+L169C	7%	Q168A+L169Q	42%
Q168A+L169E	17%	Q168A+L169R	42%
Q168A+L169F	22%	Q168A+L169S	14%
Q168A+L169H	21%	Q168A+L169T	24%
Q168A+L169I	43%	Q168A+L169V	34%
Q168A+L169K	21%	Q168A+L169W	33%
Q168A+L169M	22%	Q168A+L169Y	37%
Q168A+L169N	19%	野生型	104%

[0175] [表14]

変異	比活性	基質特異性	K _m (Mal)	K _m (Glucose)	熱安定性
Q168A+L169A	154	19%	126	33.0	86.2%
Q168A+L169C	63	13%	103	35.6	100.0%
Q168A+L169E	90	19%	8.6	20.4	100.0%
Q168A+L169F	138	27%	44.7	10.4	80.4%
Q168A+L169H	70	27%	99.2	15.5	100.0%
Q168A+L169I	43	53%	12.5	6.0	28.7%
Q168A+L169K	129	20%	20.4	26.7	100.0%
Q168A+L169M	80	23%	52.3	15.6	—
Q168A+L169N	167	22%	59.1	34.5	83.5%
Q168A+L169P	377	24%	58.0	13.9	79.9%
Q168A+L169Q	117	49%	156.9	5.4	100.0%
Q168A+L169R	32	45%	59.0	9.6	100.0%
Q168A+L169S	42	24%	15.6	21.0	—
Q168A+L169T	98	23%	33.5	15.2	83.7%
Q168A+L169V	41	27%	49.1	24.7	40.4%
Q168A+L169W	91	38%	63.3	10.8	49.4%
Q168A+L169Y	31	52%	13.6	11.6	74.3%
野生型	1285	106%	3.8	6.3	52.2%

[0176] 実施例9: A170部位の変異による基質特異性への影響

実施例2に記載の方法に準じて、A170C、A170D、A170E、A170F、A170G、A170H、A170K、A170L、A170M、A170N、A170P、A170R、A170S、A17

OT、A170W、A170Y、A170V、A170I、A170Qの各変異体を調製した。各変異体の調製にはフォワードプライマーとして配列番号69記載の合成オリゴヌクレオチドを、リバースプライマーとして配列番号69と相補的な合成オリゴヌクレオチドを使用した。調製した変異ライブラリーをスクリーニングして目的の変異体を取得した。試験管培養にて調製した破碎液を用いてマルトースに対する反応性を比較した結果を表15に示す。

[0177] [表15]

変異箇所	マルトース作用性	変異箇所	マルトース作用性
A170G	98%	A170K	87%
A170V	91%	A170R	108%
A170L	86%	A170C	92%
A170I	85%	A170M	90%
A170S	100%	A170F	82%
A170T	92%	A170Y	88%
A170D	102%	A170W	79%
A170E	103%	A170H	98%
A170N	100%	A170P	28%
A170Q	99%	野生型	98%

[0178] 実施例10:E245部位の変異による基質特異性への影響

実施例2に記載の方法に準じて、E245C、E245D、E245A、E245F、E245G、E245H、E245K、E245L、E245M、E245N、E245P、E245R、E245S、E245T、E245W、E245Y、E245V、E245I、E245Qの各変異体を調製した。各変異体の調製にはフォワードプライマーとして配列番号70記載の合成オリゴヌクレオチドを、リバースプライマーとして配列番号70と相補的な合成オリゴヌクレオチドを使用した。調製した変異ライブラリーをスクリーニングして目的の変異体を取得した。試験管培養にて調製した破碎液を用いてマルトースに対する反応性を比較した結果を表16に示す。

[0179] [表16]

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
E245A	9 9 %	E245Q	7 2 %
E245D	4 9 %	E245S	9 8 %
E245F	6 4 %	E245T	8 9 %
E245H	5 4 %	E245V	8 5 %
E245I	1 1 4 %	E245W	9 2 %
E245K	活性消失	E245Y	活性消失
E245L	活性消失	E245R	9 4 %
E245M	6 9 %	E245G	9 2 %
E245N	5 9 %	E245C	7 5 %
E245P	活性消失	野生型	9 9 %

[0180] 実施例11:N249部位の変異による基質特異性への影響

実施例2に記載の方法に準じて、N249C、N249D、N249A、N249F、N249G、N249H、N249K、N249L、N249M、N249E、N249P、N249R、N249S、N249T、N249W、N249V、N249I、N249Qの各変異体を調製した。各変異体の調製にはフォワードプライマーとして配列番号71記載の合成オリゴヌクレオチドを、リバースプライマーとして配列番号71と相補的な合成オリゴヌクレオチドを使用した。調製した変異ライブラリーをスクリーニングして目的の変異体を取得した。試験管培養にて調製した破碎液を用いてマルトースに対する反応性を比較した結果を表17に示す。

[0181] [表17]

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
N249G	8 2 %	N249K	1 8 4 %
N249A	7 7 %	N249R	1 9 1 %
N249V	1 5 7 %	N249C	1 0 7 %
N249L	9 4 %	N249M	1 7 0 %
N249I	1 3 7 %	N249F	活性消失
N249S	活性消失	N249W	活性消失
N249T	活性消失	N249H	3 4 3 %
N249D	活性消失	N249P	活性消失
N249E	8 6 %	野生型	1 0 6 %
N249Q	7 9 %		

[0182] 実施例12:E245D変異の組み合わせによる基質特異性への影響

実施例2に記載の方法に準じて、(Q168A+L169G+E245D)、(Q168A+L169P+E245D)の各変異体を調製した。各変異体の調製にはフォワードプライマーとして配列番号72記載の合成オリゴヌクレオチドを、リバースプライマーとして配列番号72と相補的な合成オリゴヌクレオチドを使用した。また、鋳型DNAとしては実施例8で取得した(Q168A+L169G)または(Q168A+L169P)のplasmidを使用した。調製した変異体を、試験管培養にて調製した破碎液でマルトースに対する反応性を比較した結果を表18に示す。

[0183] [表18]

変異	比活性	基質特異性	Km(Mal)	Km(Glc)	熱安定性
Q168A+L169G+E245D	138	11%	228.8	59.5	97.2
Q168A+L169P+E245D	382	15%	126.8	41.6	86.2
野生型	1285	107%	3.8	6.3	49.6%

[0184] 実施例13:T349部位の変異による基質特異性への影響

実施例2に記載の方法に準じて、T349S、T349P、T349Yの各変異体を調製した。各変異体の調製にはフォワードプライマーとして配列番号73記載の合成オリゴヌクレオチドを、リバープライマーとして配列番号73と相補的な合成オリゴヌクレオチドを使用した。調製した変異ライブラリーをスクリーニングして目的の変異体を取得した。試験管培養にて調製した破碎液を用いてマルトースに対する反応性を比較した結果を表19に示す。

[0185] [表19]

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
T 3 4 9 S	4 9 %	T 3 4 9 Y	9 0 %
T 3 4 9 P	3 2 %		

[0186] 実施例14:N429部位の変異による基質特異性への影響

実施例2に記載の方法に準じて、N429F、N429P、N429L、N429Yの各変異体を調製した。各変異体の調製にはフォワードプライマーとして配列番号74記載の合成オリゴヌクレオチドを、リバープライマーとして配列番号74と相補的な合成オリゴヌクレオチドを使用した。調製した変異ライブラリーをスクリーニングして目的の変異体を取得した。試験管培養にて調製した破碎液を用いてマルトースに対する反応性を比較した結果を表20に示す。

[0187] [表20]

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
N 4 2 9 F	6 9 %	N 4 2 9 L	9 7 %
N 4 2 9 P	4 4 %	N 4 2 9 Y	6 8 %

[0188] 実施例101 :PQQ依存性グルコース脱水素酵素遺伝子の発現プラスミドの構築
実施例1に記載の方法に同じ。

[0189] 実施例102:変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素の作製

野生型PQQ依存性グルコース脱水素酵素遺伝子を含む組換えプラスミドpNPG5

と配列番号75記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATA GENE製)を用いて、そのプロトコールに従って変異処理操作を行い、更に塩基配列を決定して、配列番号1記載のアミノ酸配列の74番目のアスパラギン酸がバリンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド (pNPG5-74V)を取得した。

pNPG5と配列番号76記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の342番目のメチオニンがイソロイシンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド (pNPG5-342I)を取得した。

その他上記と同様に、目的のアミノ酸部位を置換するよう設計した合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、配列番号1記載のアミノ酸配列の342番目のメチオニンがバリンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド (pNPG5-342V)、プロリンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド (pNPG5-342P)、アラニンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド (pNPG5-342A)を取得した。また146番目のセリンがアラニンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド (pNPG5-146A)、170番目のアラニンがロイシンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド (pNPG5-170L)、170番目のアラニンがメチオニンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド (pNPG5-170M)、170番目のアラニンがイソロイシンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド (pNPG5-170I)、170番目のアラニンがフェニルアラニンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド (pNPG5-170F)を取得した。それぞれの合成オリゴヌクレオチドを配列番号77-84に記載する。

pNPG5、pNPG5-74V、pNPG5-342I、pNPG5-342V、pNPG5-342P、pNPG5-342A、pNPG5-146A、pNPG5-170L、pNPG5-170M、pNPG5-170I、pNPG5-170F

0I、pNPG5-170Fの各組換えプラスミドで大腸菌コンピテントセル(エシェリヒア・コリーJM109;東洋紡績製)を形質転換し、該形質転換体をそれぞれ取得した。

[0190] 実施例103:シュードモナス属細菌で複製できる発現ベクターの構築

実施例102で得た組換えプラスミドpNPG5-74VのDNA5 μ gを制限酵素BamHIおよびXHoI(東洋紡績製)で切断して、変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素の構造遺伝子部分を単離した。単離したDNAとBamHIおよびXHoIで切断したpTM33(1 μ g)とをT4DNAリガーゼ1単位で16°C、16時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAはエシェリヒア・コリDH5 α のコンピテントセルを用いて形質転換を行った。得られた発現プラスミドをpNPG6-74Vと命名した。

pNPG5、pNPG5-342I、pNPG5-342V、pNPG5-342P、pNPG5-342A、pNPG5-146A、pNPG5-170L、pNPG5-170M、pNPG5-170I、pNPG5-170Fの各組換えプラスミドについても上記方法と同様にして発現プラスミドを取得した。得られた発現プラスミドそれぞれpNPG6、pNPG6-342I、pNPG6-342V、pNPG6-342P、pNPG6-342A、pNPG6-146A、pNPG6-170L、pNPG6-170M、pNPG6-170I、pNPG6-170Fと命名した。

[0191] 実施例104:シュードモナス属細菌の形質転換体の作製

シュードモナス・プチダTE3493(微工研寄12298号)をLBG培地(LB培地+0.3%グリセロール)で30°C、16時間培養し、遠心分離(12,000rpm、10分間)により菌体を回収し、この菌体に氷冷した300mMシュクロースを含む5mMK-リン酸緩衝液(pH7.0)8mlを加え、菌体を懸濁した。再度遠心分離(12,000rpm、10分間)により菌体を回収し、この菌体に氷冷した300mMシュクロースを含む5mMK-リン酸緩衝液(pH7.0)0.4mlを加え、菌体を懸濁した。

該懸濁液に実施例103で得た発現プラスミドpNPG6-74Vを0.5 μ g加え、エレクトロポレーション法により形質転換した。100 μ g/mlのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に生育したコロニーより、目的とする形質転換体を得た。

pNPG6、pNPG6-342I、pNPG6-342V、pNPG6-342P、pNPG6-342A、pNPG6-146A、pNPG6-170L、pNPG6-170M、pNPG6-170I、pNPG6-170F

0Fの各発現プラスミドについても上記方法と同様にして、該形質転換体をそれぞれ取得した。

[0192] 実施例105:ホロ型発現精製酵素の調製(本項は実施例101〜106にのみ適用)

500mlのTerrific brothを2L容坂口フラスコに分注し、121℃、20分間オートクレーブを行い、放冷後別途無菌濾過したストレプトマイシンを100 μ g/mlになるように添加した。この培地に100 μ g/mlのストレプトマイシンを含むPY培地で予め30℃、24時間培養したシュードモナス・プチダTE3493(pNPG6-74V)の培養液を5ml接種し、30℃で40時間通気攪拌培養した。培養終了時のPQQ依存性グルコース脱水素酵素活性は、前記活性測定において、培養液1ml当たり約30U/mlであった。

上記菌体を遠心分離により集菌し、20mMリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁した後、超音波処理により破碎し、更に遠心分離を行い、上清液を粗酵素液として得た。得られた粗酵素液をHiTrap-SP(アマシャム・ファルマシア)イオン交換カラムクロマトグラフィーにより分離・精製した。次いで10mM PIPES-NaOH緩衝液(pH6.5)で透析した後に終濃度が1mMになるように塩化カルシウムを添加した。最後にHiTrap-DEAE(アマシャム・ファルマシア)イオン交換カラムクロマトグラフィーにより分離・精製し、精製酵素標品を得た。本方法により得られた標品は、SDS-PAGE的にほぼ単一のバンドを示した。

pNPG6、pNPG6-342I、pNPG6-342V、pNPG6-342P、pNPG6-342A、pNPG6-146A、pNPG6-170L、pNPG6-170M、pNPG6-170I、pNPG6-170Fによるシュードモナス・プチダTE3493形質転換体についても上記方法と同様にして精製酵素標品を取得した。

このようにして取得した精製酵素を用いて性能を評価した。

[0193] 基質特異性(本項は実施例101〜106にのみ適用)

上記の活性測定方法に従い、PQQGDHの活性を測定した。グルコースを基質溶液とした場合の脱水素酵素活性値とマルトースを基質溶液とした場合の脱水素酵素活性値を測定し、グルコースを基質とした場合の測定値を100とした場合の相対値を求めた。マルトースを基質溶液とした場合の脱水素酵素活性に際しては、0.5Mの

マルトース溶液を調製して活性測定に用いた。結果を表102に示す。

野生型PQQGDHでは、グルコースとマルトースの反応性がほぼ等しくなっているのに対し、本願発明の改変型PQQGDHではマルトースの反応性が低下している。

[0194] [表102]

アミノ酸置換部位	マルトース作用性
M342I	79
M342V	74
M342P	80
M342A	83
D74V	90
S146A	90
A170L	77
A170M	76
A170I	74
A170F	65
野生型	100

[0195] 実施例106:多重変異体の作成と基質特異性

pNPG5、pNPG5-74V、pNPG5-342I、pNPG5-342V、pNPG5-342P、pNPG5-342A、pNPG5-146A、pNPG5-170L、pNPG5-170M、pNPG5-170I、pNPG5-170Fの各プラスミドを鋳型とし、配列番号80記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチド、168番目のグルタミンをアラニンに169番目のロイシンをプロリンに170番目のアラニンをロイシンに置換するよう設計した配列番号85記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチド、168番目のグルタミンをアラニンに169番目のロイシンをプロリンに170番目のアラニンをメチオニンに置換するよう設計した配列番号86記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチド及び245番目のグルタミン酸をアスパラギン酸に置換するよう設計した配列番号87記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドをそれぞれ用い、実施例102記載の方法に準じて、配列番号1記載のアミノ酸配列の146番目のセリンがアラニンに170番目のアラニンがロイシンに置換された変異型PQQGDHをコードする組換えプラスミド(pNPG5-146A+170L)、以下同義にて、pNPG5-168A+169P+170L、pNPG5-146A+170M、pNPG5-168A+169P+170M、pNPG5-146A+168A+169P+170L、pNPG5-146A+168A+169P+170M、pNPG5-Q168A+L169

P+A170L+E245D、pNPG5-168A+169P+170M+245D、pNPG5-146A+342I、pNPG5-168A+169P+170L+342I、pNPG5-168A+169P+170M+342I、pNPG5-146A+342V、pNPG5-168A+169P+170L+342V、pNPG5-168A+169P+170M+342V、pNPG5-146A+342P、pNPG5-168A+169P+170L+342P、pNPG5-168A+169P+170M+342P、pNPG5-146A+342A、pNPG5-168A+169P+170L+342A、pNPG5-168A+169P+170M+342A、pNPG5-74V+146A、pNPG5-74V+168A+169P+170L、pNPG5-74V+168A+169P+170M、pNPG5-168A+169P+170L+245D+342I、pNPG5-168A+169P+170M+245D+342I、pNPG5-168A+169P+170L+245D+342V、pNPG5-168A+169P+170M+245D+342V、pNPG5-168A+169P+170L+245D+342A、pNPG5-168A+169P+170M+245D+342Aを取得、さらに該形質転換体を取得した。なお、1度の変異導入により該変異プラスミドが取得できないものに関しては、異なる合成オリゴヌクレオチドを用いて、同方法を2度繰り返すことにより該変異プラスミドを取得した。

さらに実施例103〜105記載の方法に準じて、各形質転換体より、(S146A+A170L)、(Q168A+L169P+A170L)、(S146A+A170M)、(Q168A+L169P+A170M)、(S146A+Q168A+L169P+A170L)、(S146A+Q168A+L169P+A170M)、(Q168A+L169P+A170L+E245D)、(Q168A+L169P+A170M+E245D)、(S146A+M342I)、(Q168A+L169P+A170L+M342I)、(Q168A+L169P+A170M+M342I)、(S146A+M342V)、(Q168A+L169P+A170L+M342V)、(Q168A+L169P+A170M+M342V)、(S146A+M342P)、(Q168A+L169P+A170L+M342P)、(Q168A+L169P+A170M+M342P)、(S146A+M342A)、(Q168A+L169P+A170L+M342A)、(Q168A+L169P+A170M+M342A)、(D74V+S146A)、(D74V+Q168A+L169P+A170L)、(D74V+Q168A+L169P+A170M)、(Q168A+L169P+A170L+E245D+M342I)、(Q168A+L169P+A170M+E245D+M342I)、(Q168A+L169P+A170L+E245D+M342V)、(Q168A

+L169P+A170M+E245D+M342V)、(Q168A+L169P+A170L+E245D+M342A)、(Q168A+L169P+A170M+E245D+M342A)の精製酵素標品を取得し、基質特異性を評価した。結果を表103に示す。

[0196] [表103]

アミノ酸置換部位	マルトース作用性
S146A+A170L	73
Q168A+L169P+A170L	22
S146A+A170M	73
Q168A+L169P+A170M	25
S146A+Q168A+L169P+A170L	18
S146A+Q168A+L169P+A170M	22
Q168A+L169P+A170L+E245D	14
Q168A+L169P+A170M+E245D	14
S146A+M342I	75
Q168A+L169P+A170L+M342I	14
Q168A+L169P+A170M+M342I	15
S146A+M342V	73
Q168A+L169P+A170L+M342V	14
Q168A+L169P+A170M+M342V	16
S146A+M342P	76
Q168A+L169P+A170L+M342P	25
Q168A+L169P+A170M+M342P	25
S146A+M342A	78
Q168A+L169P+A170L+M342A	20
Q168A+L169P+A170M+M342A	20
D74V+S146A	78
D74V+Q168A+L169P+A170L	21
D74V+Q168A+L169P+A170M	24
Q168A+L169P+A170L+E245D+M342I	6.9
Q168A+L169P+A170M+E245D+M342I	8.8
Q168A+L169P+A170L+E245D+M342V	7.9
Q168A+L169P+A170M+E245D+M342V	8.4
Q168A+L169P+A170L+E245D+M342A	10
Q168A+L169P+A170M+E245D+M342A	14
野生型	102

[0197] [実施例201]

以下、配列番号1に記載されるピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素において、Q168A、(Q168A+L169G)、(Q168A+L169C)、(Q168A+L169P)、(Q168S+L169E)、(Q168S+L169P)の各改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素を用いて、本発明を具体的に説明する。言うまでもなく、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

なお、本実施例で使用したQ168A、(Q168A+L169G)、(Q168A+L169C)、(Q168A+L169P)、(Q168S+L169E)、(Q168S+L169P)各改変型ピロロ

キノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の精製酵素標品は、以下に記載の手順で取得した。

[0198] PQQ依存性グルコース脱水素酵素遺伝子の発現プラスミドの構築

野生型PQQ依存性グルコース脱水素酵素の発現プラスミドpNPG5は、ベクターpBluescript SK(−)のマルチクローニング部位にアシネトバクター・バウマンニ(*Acinetobacter baumannii*) NCIMB11517株由来のPQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする構造遺伝子を挿入したものである。その塩基配列を配列表の配列番号2に、また該塩基配列から推定されるPQQ依存性グルコース脱水素酵素のアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

[0199] 変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素の作製

野生型PQQ依存性グルコース脱水素酵素遺伝子を含む組換えプラスミドpNPG5と配列番号88記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、QuickChange(TM) Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATA GENE製)を用いて、そのプロトコールに従って変異処理操作を行い、更に塩基配列を決定して、配列番号1記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがアラニンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M168A)を取得した。

pNPG5と配列番号89記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがアラニンに、169番目のロイシンがグリシンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M168A+169G)を取得した。

pNPG5と配列番号90記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがアラニンに、169番目のロイシンがシステインに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M168A+169C)を取得した。

pNPG5と配列番号91記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリ

ゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがアラニンに、169番目のロイシンがプロリンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M168A+169P)を取得した。

pNPG5と配列番号92記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがセリンに、169番目のロイシンがグルタミン酸に置換された変異型PQ

Q依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M168S+169E)を取得した。

pNPG5と配列番号93記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号1記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがセリンに、169番目のロイシンがプロリンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M168S+169P)を取得した。

pNPG5M168A、pNPG5M168A+169G、pNPG5M168A+169C、pNPG5M168A+169P、pNPG5M168S+169E、pNPG5M168S+169Pの各組換えプラスミドで大腸菌コンピテントセル(エシェリヒア・コリーJM109;東洋紡績製)を形質転換し、該形質転換体をそれぞれ取得した。

[0200] シュードモナス属細菌で複製できる発現ベクターの構築

組換えプラスミドpNPG5M168AのDNA5 μ gを制限酵素BamHIおよびXhoI(東洋紡績製)で切断して、変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素の構造遺伝子部分を単離した。単離したDNAとBamHIおよびXhoIで切断したpTM33(1 μ g)とをT4DNAリガーゼ1単位で16℃、16時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAはエシェリヒア・コリDH5 α のコンピテントセルを用いて形質転換を行った。得られた発現プラスミドをpNPG6M168Aと命名した。

pNPG5M168A+169G、pNPG5M168A+169C、pNPG5M168A+169P、pNPG5M168S+169E、pNPG5M168S+169Pの各組換えプラスミドについ

でも上記方法と同様にして発現プラスミドを取得した。得られた発現プラスミドそれぞれpNPG6M168A+169G、pNPG6M168A+169C、pNPG6M168A+169P、pNPG6M168S+169E、pNPG6M168S+169Pと命名した。

[0201] シュードモナス属細菌の形質転換体の作製

シュードモナス・プチダTE3493(微工研寄12298号)をLBG培地(LB培地+0.3%グリセロール)で30℃、16時間培養し、遠心分離(12,000rpm、10分間)により菌体を回収し、この菌体に氷冷した300mMシュウクロースを含む5mMK-リン酸緩衝液(pH7.0)8mlを加え、菌体を懸濁した。再度遠心分離(12,000rpm、10分間)により菌体を回収し、この菌体に氷冷した300mMシュウクロースを含む5mMK-リン酸緩衝液(pH7.0)0.4mlを加え、菌体を懸濁した。

該懸濁液に発現プラスミドpNPG6M168Aを0.5 μ g加え、エレクトロポレーション法により形質転換した。100 μ g/mlのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に生育したコロニーより、目的とする形質転換体を得た。

pNPG6M168A+169G、pNPG6M168A+169C、pNPG6M168A+169P、pNPG6M168S+169E、pNPG6M168S+169Pについても、それぞれ同様に実施し、目的とする形質転換体を得た。

[0202] ホロ型発現精製酵素の調製方法

500mlのTerrific brothを2L容坂口フラスコに分注し、121℃、20分間オートクレーブを行い、放冷後別途無菌濾過したストレプトマイシンを100 μ g/mlになるように添加した。この培地に100 μ g/mlのストレプトマイシンを含むPY培地で予め30℃、24時間培養したシュードモナス・プチダTE3493(pNPG6M168A)の培養液を5ml接種し、30℃で40時間通気攪拌培養した。菌体を遠心分離により集菌し、20mMリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁した後、超音波処理により破碎し、更に遠心分離を行い、上清液を粗酵素液として得た。得られた粗酵素液をHiTrap-SP(アマシャム・ファルマシア)イオン交換カラムクロマトグラフ

ィーにより分離・精製した。次いで10mM PIPES-NaOH緩衝液(pH6.5)で透析した後終濃度が1mMになるように塩化カルシウムを添加した。最後にHiTrap-D EAE(アマシャム・ファルマシア)イオン交換カラムクロマトグラフィーにより分離・精製

し、精製酵素標品を得た。本方法により得られた標品は、SDS-PAGE的にほぼ単一なバンドを示した。

pNPG6M168A+169G、pNPG6M168A+169C、pNPG6M168A+169P、pNPG6M168S+169E、pNPG6M168S+169Pによるシュードモナス・プチダTE3493形質転換体についても上記方法と同様にして精製酵素標品を取得した。

このようにして取得した精製酵素を用いて性能を評価した。

[0203] フェリシアン化物イオンをメディエーターとするピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素活性の測定方法

・ 測定原理

D-グルコース+フェリシアン化物イオン+PQQGDH→

D-グルコノ-1, 5-ラクトン + フェロシアン化物イオン

フェリシアン化物イオンの還元により生じたフェロシアン化物イオンの存在は、分光光度法により波長420nmでの吸光度の減少を測定することで確認した。

・ 単位の定義

1単位は、以下に記載の条件下で1分当たり1ミリモルのD-グルコースを酸化させるピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の酵素量をいう。

(3) 方法

試薬

A. D-グルコース溶液:1M(1.8g D-グルコース(分子量180.16)/10mlH₂O)

B. PIPES-NaOH緩衝液, pH6.5:50mM(60mLの水中に懸濁した1.51gのPIPES(分子量302.36)を、5N NaOHに溶解し、2.2mlの10% Triton X-100を加える。5N NaOHを用いて25℃でpHを6.5±0.05に調整し、水を加えて100mlとした。)

C. フェリシアン化カリウム溶液:50mM(0.165g フェリシアン化カリウム(分子量329.25)/10ml H₂O)

D. 蒸留水

E. 酵素希釈液:1mM CaCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.1% BSAを含

む50mM PIPES-NaOH緩衝液(pH6. 5)

手順

1. 遮光ビンに以下の反応混合物を調製し、氷上で貯蔵した(用事調製)

0. 9ml D-グルコース溶液 (A)

25. 5ml PIPES-NaOH緩衝液(pH6. 5) (B)

2. 0ml フェリシアン化カリウム溶液 (C)

1. 0ml 蒸留水 (D)

反応混合物中の濃度を表201に示す。

[0204] [表201]

反応混合物中の濃度		
PIPES 緩衝液	42	mM
D-グルコース	30	mM
フェリシアン化カリウム	3. 4	mM

[0205] 2. 3. 0mlの反応混合液を試験管(プラスチック製)に入れ、37℃で5分間予備加温した。

3. 0. 1mlの酵素溶液を加え、穏やかに混合した。

4. 420nmでの水に対する吸光度の減少を37℃に維持しながら分光光度計で4〜5分間記録し、曲線の初期直線部分からの1分間当たりの ΔOD を計算した(ODテスト)

同時に、酵素溶液に代えて酵素希釈液(E)加えることを除いては同一の方法を繰り返し、ブランク(ΔOD ブランク)を測定した。

酵素溶液は、アッセイの直前に氷冷した酵素希釈液(E)で1. 0U/ml程度に希釈した(該酵素の接着性のためにプラスチックチューブの使用が好ましい)

[0206] 計算

活性を以下の式を用いて計算する:

体積活性(U/ml) = { Δ OD / min (Δ ODテスト - Δ ODブランク) \times Vt \times df } / (

1.04 \times 1.0 \times Vs)

重量活性(U/mg) = (U/ml) \times 1 / C

Vt: 総体積(3.1ml)

Vs: サンプル体積(0.1ml)

1.04: フェリシアン化カリウムのミリモル分子吸光係数

1.0: 光路長(cm)

df: 希釈係数

C: 溶液中の酵素濃度(c mg/ml)

[0207] 比活性の測定

単位液量あたりのタンパク含量をBradford法を原理とするプロテインアッセイにより測定した。実際にはBiorad社製のプロテインアッセイキットを用い、そのプロトコールに従った。5倍希釈した市販の染色液5mlに0.1mlの酵素溶液を添加し、混和後、室温にて30分放置した後、595nmの波長にて吸光度を測定した。この際、濃度既知のウシ血清アルブミンを同様に測定することで検量線を作成し、それより各酵素溶液の単位液量あたりのタンパク含量を測定した。

一方、上記活性測定法により単位液量あたりの活性値を測定し、単位液量あたりの活性値を単位液量あたりのタンパク含量で割ることで、ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の比活性を求めた。

結果を表202に示す。

[0208] [表202]

変異	比活性(U/mg)
野生型	1.0
Q168A	8.6
Q168A+L169G	2.5
Q168A+L169C	1.9
Q168A+L169P	20.1
Q168S+L169E	1.1
Q168S+L169P	13.1

[0209] 比活性測定の結果、フェリシアン化物イオンをメディエーターとして酵素活性を測定した場合、いずれの改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素においても、野生型と比較して、比活性の増大を確認することが出来た。

- [0210] 野生型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸を欠失、置換もしくは付加することにより、比活性が増大する理由としては、次のような推論が可能である。
- [0211] ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の詳細な反応メカニズムは、基質であるD-グルコースが酸化されて、電子が酵素に配位しているピロロキノリンキノンに伝達し、さらにメディエーターであるフェリシアン化物イオンに伝達するというものである。そして、酵素反応の律速となるポイントは、ピロロキノリンキノンからフェリシアン化物イオンへの反応性が低いことから、メディエーターであるフェリシアン化物イオンに電子が伝達される過程にあると考えられる。
- [0212] 例えば、活性中心近傍のアミノ酸を変異した場合を考えると、活性中心を含む活性中心近傍の酵素の立体構造が変化し、フェリシアン化物イオンが進入しやすくなるため、酵素反応の律速となっていたフェリシアン化物イオンへの電子伝達がスムーズになり、その結果、比活性が向上したと考えられる。
- [0213] すなわち、活性中心近傍のアミノ酸を1つあるいはそれ以上置換変異させることにより、同様にフェリシアン化物イオンをメディエーターとする酵素活性測定において比活性の向上が望めると推察する。あるいは別の見方では、本発明において、変異は活性中心から半径10オングストローム以内に存在するアミノ酸に対して行なわれることが望ましい。

活性中心近傍のアミノ酸としては、76位、143位、144位、163位、168位、169位、228位、229位、247位、248位、343位、346位、348位、377位、406位、408位、424位に位置するアミノ酸が具体的に挙げられる(たとえば、非特許文献5を参照)。

非特許文献5:Protein Science(2000), 9:1265-1273

[0214] [実施例202]

また、実施例201で確認された比活性向上効果は、活性中心非近傍のアミノ酸置換を加えても維持されていることを、(Q168A+L169G+E245D)、(Q168A+L169P+E245D)の各改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素を用いて、具体的に説明する。言うまでもなく、本発明は実施例に限定されるものではない。

い。

なお、本実施例で使用した(Q168A+L169G+E245D)、(Q168A+L169P+E245D)各改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の精製酵素標品取得及び性能評価は、実施例201と同様に実施した。pNPG5M168A+169Gと配列番号94記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、配列番号1記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがアラニンに、169番目のロイシンがグリシンに、さらに245番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M168A+169G+E245D)を、同様にpNPG5M168A+169Pより配列番号1記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがアラニンに、169番目のロイシンがプロリンに、さらに245番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M168A+169P+E245D)を作成した。これら組換えプラスミドを実施例201と同様に処理することにより、発現ベクターの構築、シュードモナス属細菌の形質転換体の作製、ホロ型発現精製酵素の調製、さらに性能評価を実施した。結果を表203に示す。

[0215] [表203]

変異	比活性(U/mg)
野生型	0.9
Q168A+L169G+E245D	7.8
Q168A+L169P+E245D	22.8

[0216] 実施例202の結果より、活性中心非近傍に導入したアミノ酸置換は、活性中心近傍に導入したアミノ酸置換変異による比活性向上効果を妨げるものではないことが確認された。

産業上の利用可能性

[0217] 本発明によれば、基質特異性が改善されたPQQGDH、好ましくは熱安定性も改善されたPQQGDHを得ることができる。この改変型PQQGDHは、グルコースアッセイキット、グルコースセンサに利用できる。

また、本発明の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素は、比活性向上により、測定系への酵素添加量の減量を可能にすることから、フェリシアン化

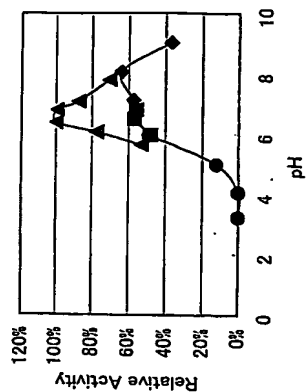
物イオンをメディエーターとする、グルコースアッセイキットやグルコースセンサーの安価な製造を可能にする。臨床検査や食品分析など幅広い用途分野に利用することが出来、産業界に寄与することが大である。

請求の範囲

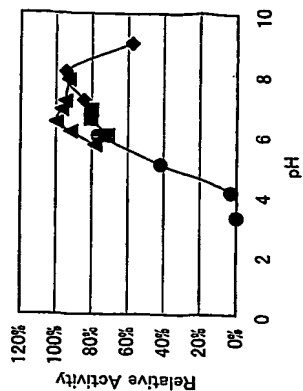
- [1] 野生型のピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ(PQQGDH)よりも二糖類に対する作用性が低下した改変型PQQGDH。
- [2] 野生型のピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ(PQQGDH)よりも安定性が向上した請求項1に記載の改変型PQQGDH。
- [3] 野生型ピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ(PQQGDH)のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸を欠失、置換もしくは付加することにより、野生型と比較して、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において、比活性を向上させる方法
- [4] 請求項3に記載の方法により、野生型と比較して、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において比活性が向上した、改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ(PQQGDH)
- [5] 請求項1または3に記載の改変型PQQGDHをコードする遺伝子。
- [6] 請求項5に記載の遺伝子を含むベクター。
- [7] 請求項6に記載のベクターで形質転換された形質転換体。
- [8] 請求項7に記載の形質転換体を培養することを特徴とする改変型PQQGDHの製造法。
- [9] 請求項1または3に記載の改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキット。
- [10] 請求項1または3に記載の改変型PQQGDHを含むグルコースセンサー。
- [11] 請求項1または3に記載の改変型PQQGDHを含むグルコース測定方法。

[X1]

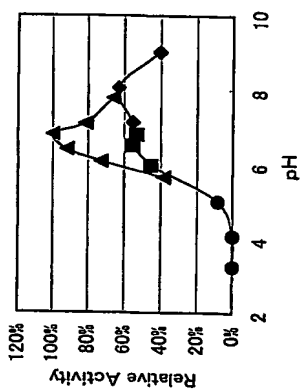
Q168V



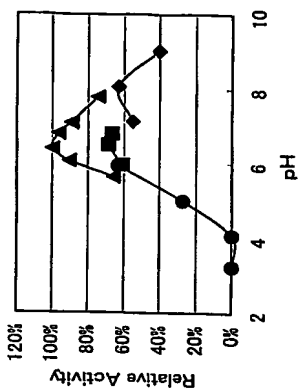
野生型



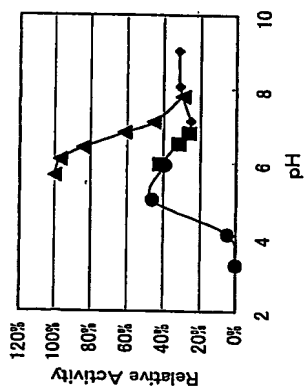
Q168I



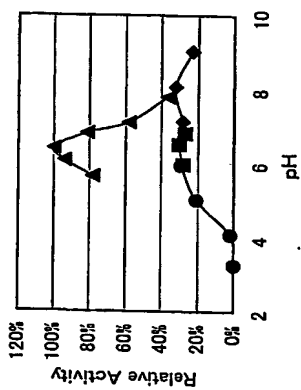
Q168A



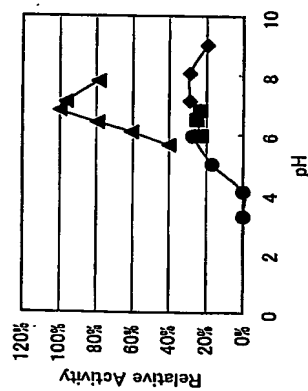
Q76E



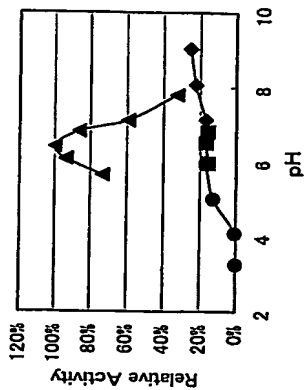
Q76M



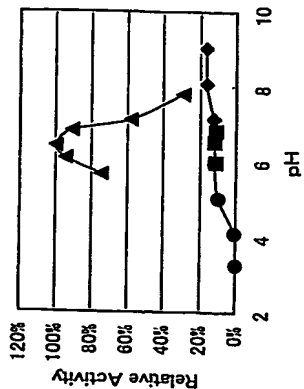
Q76K



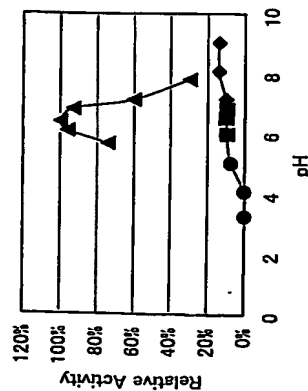
Q76N



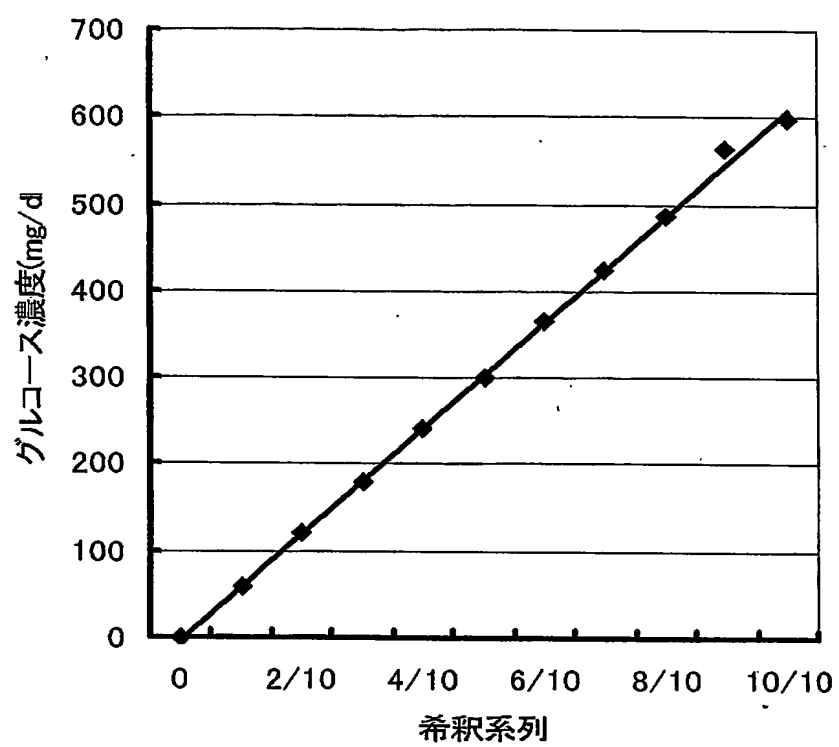
Q76T



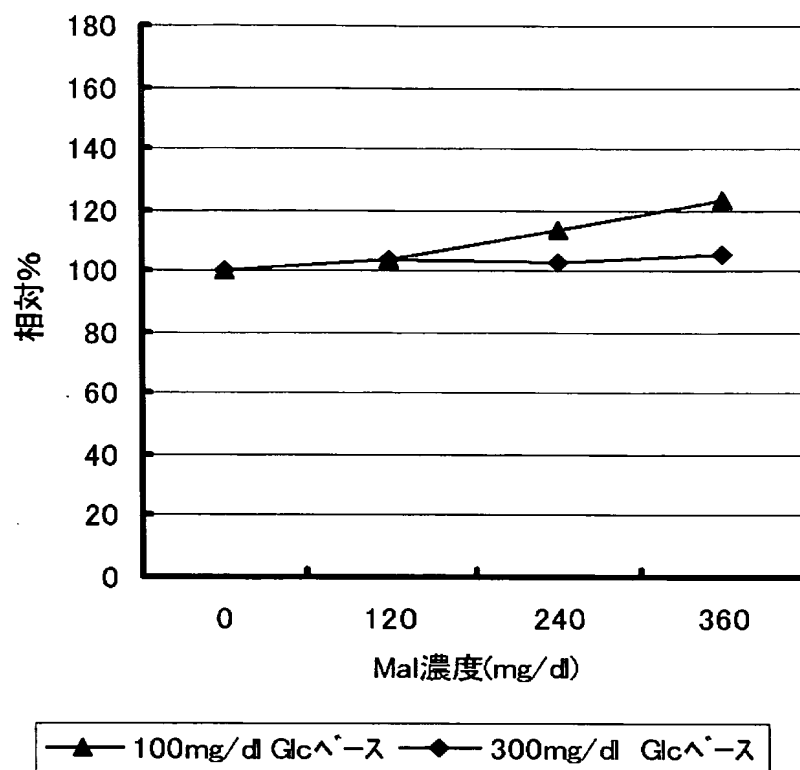
Q76G



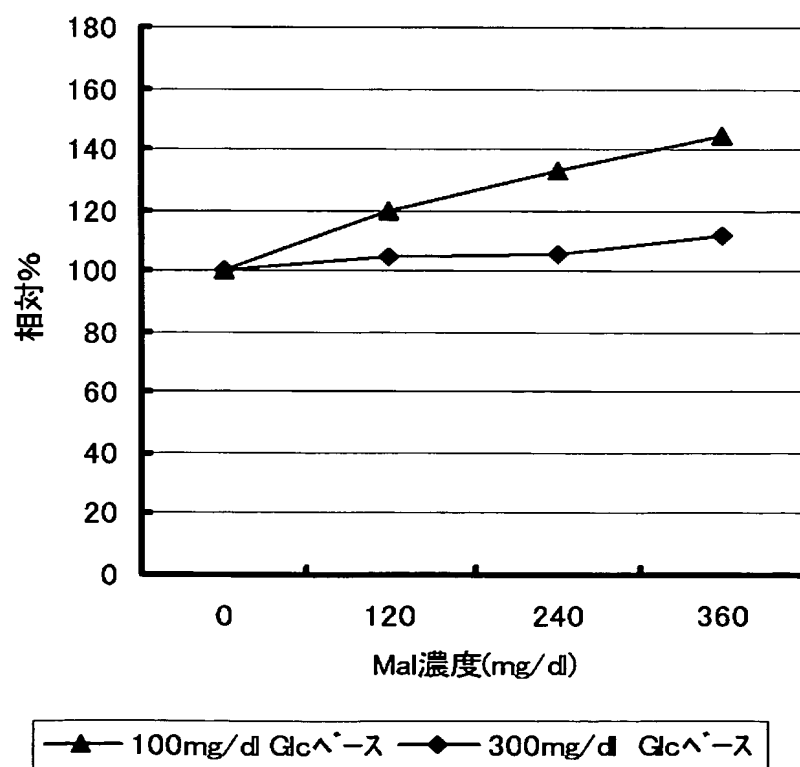
[図2]



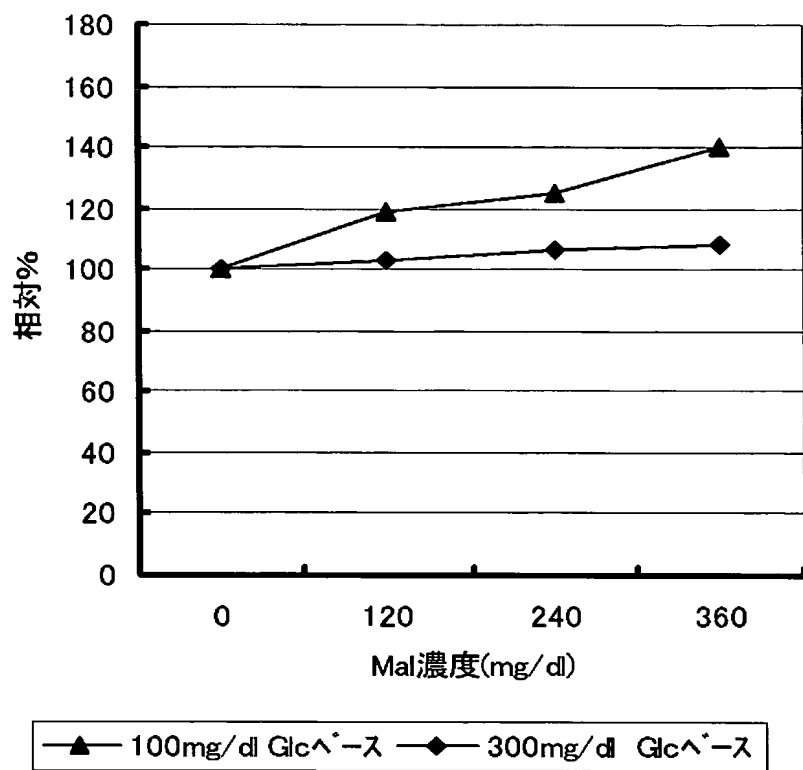
[図3]



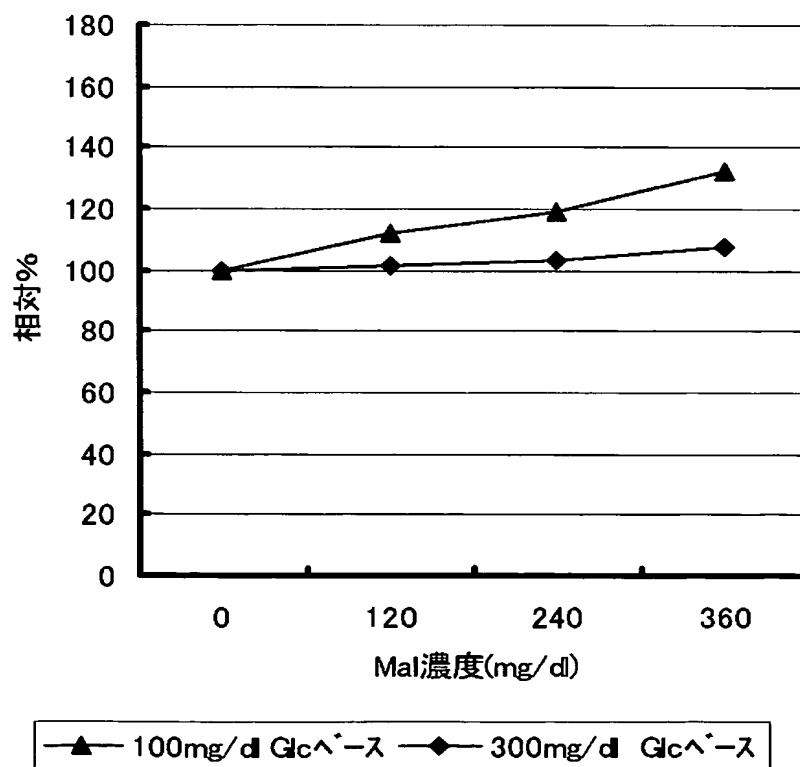
[図4]



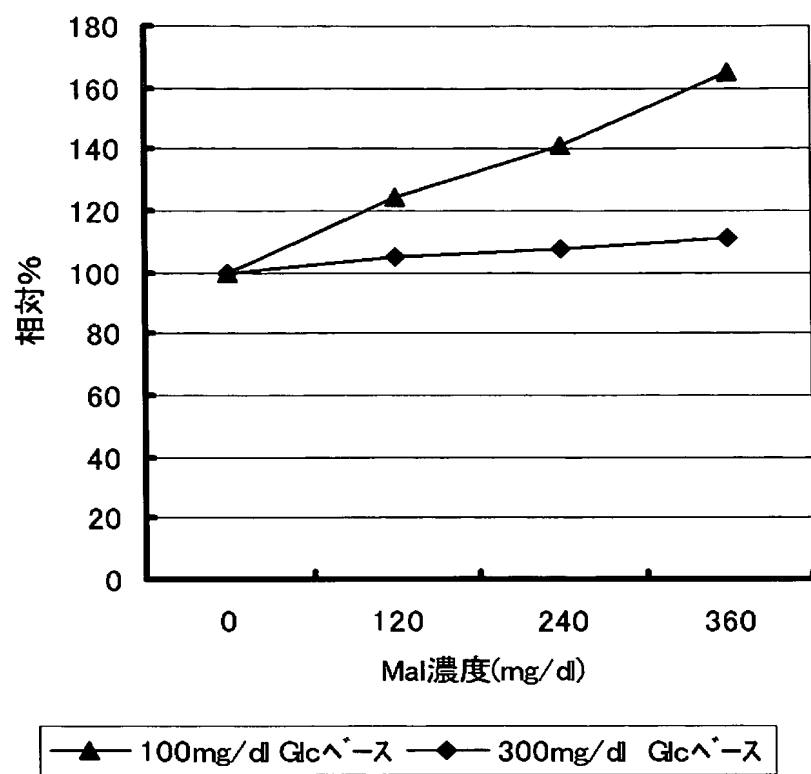
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012508

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N9/04, C12N15/53, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21,
C12Q1/32, C12M1/40, G01N33/66

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N9/04, C12N15/53, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21,
C12Q1/32, C12M1/40, G01N33/66

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2001-346587 A (Koji HAYAIDE), 18 December, 2001 (18.12.01), Full text (Family: none)	1-11
P,X	EP 1367120 A2 (Toyo Boseki Kabushiki Kaisha), 03 December, 2003 (03.12.03), Full text & US 2003/0232418 A1	1-11
P,X	JP 2004-173538 A (Amano Enzyme Inc.), 24 June, 2004 (24.06.04), Full text (Family: none)	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
18 October, 2004 (18.10.04)

Date of mailing of the international search report
02 November, 2004 (02.11.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012508

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012508

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

The matter common to claims 1, 2 and 5 to 11 and claims 3 and 4 resides in a mutated pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase.

As the results of the search, however, it is clarified that this mutated pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase is not novel because of having been reported in document JP 11-243949 A (Toyobo Co., Ltd.) 14 September, 1999 (14.09.99).

As a result, the mutated pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase falls within the category of prior art and, therefore, this common matter is not a special technical feature in the meaning with the second sentence of PCT Rule 13.2.

Accordingly, there is no matter common to all claims.

Since there is no other common matter seemingly being a special technical feature in the meaning with the second sentence of PCT Rule 13.2, no technical relevancy in the meaning within PCT Rule 13 can be found out between these invention groups differing from each other.

Such being the case, it is obvious that claims 1 to 11 do not comply with the requirement of unity of invention.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N9/04, C12N15/53, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12Q1/32, C12M1/40, G01N33/66

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N9/04, C12N15/53, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12Q1/32, C12M1/40, G01N33/66

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2001-346587 A (早出広司) 2001. 12. 18, 全文 (ファミリーなし)	1-11
P X	EP 1367120 A2 (Toyo Boseki Kabushiki Kaisha) 2003. 12. 03, 全文 & US 2003/0232418 A1	1-11
P X	JP 2004-173538 A (天野エンザイム株式会社) 2004. 06. 24, 全文 (ファミリーなし)	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用と展示等に関する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 10. 2004

国際調査報告の発送日

02.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4 N

3 1 2 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

(特別ページ参照)

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲 1-2、5-11 と、請求の範囲 3-4 に共通の事項は、変異型ピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼである。

しかしながら、調査の結果、この変異型ピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼは、文献 JP 11-243949 A (東洋紡績株式会社) 1999. 09. 14 に記載されているから、新規でないことが明らかとなった。

結果として、変異型ピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼは先行技術の域を出ないから、PCT 規則 13. 2 の第 2 文の意味において、この共通事項は特別な技術的特徴ではない。

それ故、請求の範囲全てに共通の事項はない。

PCT 規則 13. 2 の第 2 文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の意味他の共通の事項は存在しないので、それらの相違する発明の間に PCT 規則 13 の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

よって、請求の範囲 1-11 は、発明の単一性の要件を満たしていないことが明らかである。